N-tact® PTH SP

IRMA Kit

For the quantitative determination of biologically active intact hPTH 1-84 in serum or plasma by immunoradiometric assay

Instruction Manual
Manuel d'Instructions
Testanleitung
Manual de Instrucciones
Manuale di Istruzione
Manual de instruções
Bruksanvisning
Εγχειρίδιο οδηγιών

**Catalog No./REF./KAT.-NR./N° de Catálogo/
Numero di Catalogo/Nº de Catálogo/Katalognummer/
Αριθμός καταλόγου: 26100**

DiaSorin

Stillwater, Minnesota 55082-0285, U.S.A.

TABLE OF CONTENTS

N-TACT® PARATHYROID HORMONE IMMUNORADIOMETRIC ASSAY

1. INTENDED USE

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE.
This kit contains instructions and materials for the quantitative determination of biologically active intact human parathyroid hormone (hPTH 1-84) in serum or plasma by immunoradiometric assay (IRMA).

2. SUMMARY AND EXPLANATION

The maintenance of proper calcium levels in cells and extracellular fluids is of fundamental importance for many biological processes, and parathyroid hormone (PTH) is one of the most important regulators of calcium homeostasis.

Clinically, the measurement of PTH is used in conjunction with calcium determinations to assess disorders in calcium metabolism.[1-3] The measurement of PTH has proven to be difficult due to the heterogeneity of peptides that occur in both the gland and circulation.[4]
PTH is synthesized in the parathyroid glands as a 115 amino acid precursor referred to as preproparathyroid hormone. Preproparathyroid hormone is converted to a 90 amino acid intermediate form, proparathyroid hormone.[5] Additional proteolytic action converts the intermediate hormone to biologically active PTH 1-84.[6] In addition to the formation of fragments within the gland, there is further proteolytic breakdown of PTH once it is released into the circulation.[7, 8]

Scientific studies indicate only intact PTH and PTH fragments containing the 1-34 amino acid sequence contain biological activity. Insignificant concentrations of the N-terminal fragment(s) contribute to the circulating pool of immunoreactive parathyroid hormone. Therefore, when using PTH levels to evaluate patients, the measurement of intact PTH correlates best with their state of calcium metabolism.[9-13]

Parathyroid hormone and its fragments are cleared from the circulation by both the kidneys and liver.[14] The clearance of C-terminal fragments is slower than the clearance of the intact hormone and is more dependent upon renal mechanisms.[15] In patients with severe or end-stage renal failure, C-terminal fragments accumulate to very high levels. When using a C-terminal specific PTH assay, elevated PTH concentrations may be found simply because of diminished clearance of these biologically inactive fragments, complicating the differentiation of hypercalcemia.[8,16-18]

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The DiaSorin intact PTH SP immunoradiometric assay (IRMA) utilizes 2 different polyclonal antibodies that have been purified using affinity chromatography. These purified antibodies are specific for 2 different regions of the PTH molecule.

The first antibody, specific for PTH 39-84, is bound to a solid phase (polystyrene beads). The second antibody is specific for PTH 1-34 and is labeled with iodine-125. Samples are incubated simultaneously with both antibodies. Intact PTH 1-84 contains both the 1-34 and the 39-84 amino acid sequences and is the only form of PTH that will be bound by both the antibody on the bead and the antibody labeled with iodine-125.

Since the antibody coupled to the solid phase is specific for C-terminal and mid-region fragments as well as intact PTH, the capacity of the solid phase has been designed to accommodate very high levels of PTH. This prevents interference by extremely elevated C-terminal and mid-region PTH fragments in unknown samples.

Following the incubation period, each bead is washed to remove any unbound labeled antibody. The radioactivity present in the remaining bound labeled antibody is then measured using a gamma counter.

Concentrations of intact PTH present in the samples are directly proportional to the radio-activity measured.

4. REAGENTS PROVIDED IN THE KIT

N-Tact PTH SP Calibrator 0	1 vial/15 mL
N-Tact PTH SP Calibrators 1-5	5 vials/2.0 mL
N-Tact PTH SP Beads	1 container/100 beads
^{125}I N-Tact PTH SP Antibody	2 vials/5 mL
N-Tact PTH SP Wash Solution Conc.	1 vial/ 50 mL
N-Tact PTH SP Controls	2 vials/ 2.0 mL
Number of tests	100

STORAGE: Upon receipt, the kit should be stored at 2-8°C. After opening, store each reagent at 2-8° until the expiration date on the label. Reagents should not be used past the expiration date. The expiration date of the kit is reported on the external label and corresponds to the expiration date of the tracer.

When reconstituting the contents of the vials, mix gently to avoid foaming. Store all reconstituted reagents at –15°C or lower immediately following use. Reagents from different batches must not be mixed.

4.1 N-tact PTH SP Calibrator 0: ready to use reagent

Contains human serum with 0.1% sodium azide added as a preservative.

4.2 N-tact PTH SP Calibrators 1-5: lyophilized reagent

Set of 5 human PTH 1-84 calibrators, at nominal concentrations ranging from 15-2000 pg/mL, contains 0.1% sodium azide and other stabilizers. Exact concentration values are assigned with each lot. Reconstitute each vial of lyophilized calibrator with 2.0 mL of the 0 calibrator provided, mix by swirling and allow them to stand for 5 minutes at 2-8°C or until the contents are completely dissolved. The kit calibrators are calibrated using Synthetic Human PTH. The kit calibrators demonstrate commutability with patient samples when used with reagents and operating procedure of this in vitro diagnostic test as recommended.

4.3 N-tact PTH SP Beads: ready to use reagent

Polystyrene beads are coated with affinity-purified goat antibody specific for the 39-84 sequence of PTH.

4.4 ^{125}I N-tact PTH SP Antibody: ready to use reagent

Each vial contains 5.0 mL of affinity purified goat antibody specific for PTH 1-34, labeled

with iodine-125. The labeled antibody is diluted in buffered serum containing red dye and 0.1% sodium azide.

4.5 N-tact PTH SP Wash Solution Concentrate: reagent in solution

Contains a concentrated buffered surfactant. Prepare a working wash solution by diluting the entire vial contents with 450 mL of distilled or deionized water. Store the working wash solution at room temperature.

4.6 N-tact PTH SP Control, Level 1 and Level 2: lyophilized reagent

Human serum is spiked with hPTH 1-84 to obtain a concentration within a specified range. 0.1% sodium azide is added. Reconstitute each lyophilized control with 2.0 mL of distilled or deionized water, mix and allow to stand at 2-8°C until the contents are completely dissolved. Ranges for each lot are printed on the control vials.

5. WARNINGS AND PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE.
Not for internal or external use in humans or animals.

REAGENTS CONTAINING HUMAN SOURCE MATERIAL

Treat as potentially infectious.

Each serum/plasma donor unit used in the preparation of this product has been tested by a U.S. FDA approved method and found non-reactive for the presence of HBsAg, antibody to HCV and antibody to HIV 1/2. While these methods are highly accurate, they do not guarantee that all infected units will be detected. This product may also contain other human source material for which there is no approved test. Because no known test method can offer complete assurance that hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), Human Immunodeficiency Virus (HIV) or other infectious agents are absent, all products containing human source material should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions as described in the U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4th., May 1999 or current edition.

REAGENTS CONTAINING SODIUM AZIDE

CAUTION: Some reagents in this kit contain sodium azide. Sodium azide may react with lead or copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up. For further information, refer to "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," in the Manual Guide-Safety Management No. CDC-22 issued by the Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 1976.

European Communities Hazardous Substance Risk Phrases (Council Directive 1999/45/EC)

R20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.
R32 - Contact with acids liberates very toxic gas.
S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water.

REAGENTS CONTAINING IODINE-125

This kit contains radioactive material which does not exceed 20 µCi (740kBq) of iodine-125. Appropriate precautions and good laboratory practices should be used in the storage, handling, and disposal of this material.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a general license:
This radioactive material may be received, acquired, possessed and used only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories or hospitals, and only for in vitro clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to the regulations and the general license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or of the state with which the Commission has entered into an agreement for the exercise of regulatory authority.

1. Storage of radioactive material should be limited to a specifically designated area.
2. Access to radioactive materials must be limited to authorized personnel only.
3. Do not pipette radioactive material by mouth.
4. Do not eat or drink within designated radioactive work areas.
5. Areas where spills may occur should be wiped up, then washed with an alkali detergent or radiological decontamination solution. Any glassware used must be rinsed completely with water before washing with other laboratory glassware.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a specific license:
The receipt, use, transfer and disposal of radioactive materials are subject to the regulations and conditions of your specific license.
WARNING: This product contains a chemical known to the State of California to cause cancer.

ATTENTION: Radioactivity printed in the package insert may be slightly different from the radioactivity printed on the box label and on the tracer vial label. The box label and the tracer vial label indicate the actual amount of radioactivity at the calibration date where the package insert indicates the theoretical radioactivity of the kit.

6. INDICATIONS OF POSSIBLE DETERIORATION OF KIT REAGENTS

6.1 A shift in the slope or position of the calibrator curve from what is normally obtained.

6.2 A decrease in maximum binding.

6.3 High nonspecific zero binding.

6.4 Poor duplicate values.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARTION

Two hundred microliters of serum or EDTA plasma, in duplicate, are required for use in the N-tact PTH SP assay.

Either human serum or plasma may be used in this kit. The anticoagulants EDTA may be used with this assay. A fasting specimen is recommended, but not required. Blood should be collected aseptically by venipuncture in a 5 or 10 mL evacuated glass tube. Allow the blood to clot at room temperature (15-25°C). Centrifuge for 15 minutes using approximately 760 x g* to obtain hemolysis free sera. No additives or preservatives are required to maintain integrity of the sample. All plastics, glassware or other material coming into contact with the specimen should be entirely free of any contamination. Store serum or plasma samples at -20°C or lower. Specimens may be stored in glass or plastic vials, as long as the vials are tightly sealed to prevent desiccation of the sample.

Normal EDTA plasma and serum samples were compared by DiaSorin laboratories. No significant differences in values were seen.

8. ASSAY PROCEDURE

8.1 Reconstitute the lyophilized reagents and allow any frozen specimens to thaw completely. Keep reagents and thawed specimens on ice while setting up assay.

8.2 Set up labeled 12 x 75 mm borosilicate glass tubes in duplicate according to the Scheme of the Assay.

8.3 Add reagents to the tubes as follows:

- **a. Total count tubes**
  100 µL ^{125}I N-tact PTH SP Antibody (red)
- **b. Calibrator 0**
  200 µL calibrator 0
  100 µL ^{125}I N-tact PTH SP Antibody (red)
- **c. Calibrators (1-5)**
  200 µL calibrator
  100 µL ^{125}I N-tact PTH SP Antibody (red)
- **d. Controls and unknown samples**
  200 µL sample
  100 µL ^{125}I N-tact PTH SP Antibody (red)

8.4 Vortex all tubes.

*g = (1118 x 10^{-8}) (radius in cm) $(rpm)^2$

8.5 Dispense one bead into each tube with teflon-coated forceps or suitable dispenser for handling beads. (Do not use fingers.)

8.6 Cover the tubes with parafilm or equivalent.

8.7 Incubate the tubes for 22 (±2) hours at 20-25°C.

8.8 Aspirate the reaction mixture from each tube.

8.9 Wash the beads by vigorously dispensing 1 mL of wash solution into each tube with sufficient force to raise the bead from the bottom of the test tube. Aspirate wash solution. Repeat wash procedure 3 times.

8.10 Measure the radioactivity present in each tube using a gamma counter.

9. EQUIPMENT AND MATERIALS REQUIRED, BUT NOT SUPPLIED

9.1 Disposable borosilicate glass tubes, 12 x 75 mm.

9.2 Test tube rack.

9.3 Gamma counter capable of counting iodine-125.

9.4 Vortex mixer.

9.5 Pipetting devices:

- **a.** Micropipettor calibrated to deliver 200 µL.
- **b.** Repeating dispensers, calibrated to deliver 100 µL and 1 mL.
- **c.** Volumetric pipettes for reconstituting controls and calibrators.

9.6 Parafilm or equivalent for covering test tubes.

9.7 Teflon-coated forceps or other kit-approved device for dispensing beads.

9.8 Aspiration unit to aspirate ^{125}I antibody and wash solutions.

10. PROCEDURAL COMMENTS

10.1 When adding beads to the tubes, tilt the test tube rack slightly and allow beads to roll into the tubes. This will prevent excessive splashing of the test solution. Do not handle beads with fingers.

10.2 Pipette ^{125}I antibody to lower one third of the test tube.

10.3 In order for a laboratory to completely monitor the consistent performance of an RIA assay there are additional factors which must be checked. DiaSorin suggests a check for every assay of the following parameters to assure consistent kit per-formance.

a. Total Counts

b. Maximum Binding
Counts per minute (CPM) of 2000 Calibrator Tube

c. Nonspecific Binding
CPM of 0 Calibrator Tube

11. QUALITY CONTROL

Each laboratory should include both kit control sera in every assay to ensure the validity of each assay's results. A mean and standard deviation should then be determined for each control using a minimum of ten (10) assays. An acceptable range of values may then be obtained for these controls using ±2 standard deviations of the values previously determined. The DiaSorin Quality Control Laboratory has determined a range for the controls included in this kit.

*g = (1118×10^{-8}) (radius in cm) $(rpm)^2$

12. CALCULATION OF RESULTS

To determine the concentration of intact PTH found in unknown and control samples, a calibrator curve is prepared using the calibrator concentrations stated on the vial labels. Values are generated as follows:

12.1 Calculate the average CPM for each calibrator, control, and unknown sample.

12.2 Subtract the average CPM of the 0 calibrator tubes from all other average counts to obtain corrected CPMs.

12.3 Using log-log graph paper, plot the corrected CPM of each calibrator level on the ordinate against the calibrator concentration on the abscissa.

12.4 Interpolate the levels of PTH in the samples from the plot.

12.5 If any unknown sample reads greater than the highest calibrator, it should be diluted appropriately with 0 calibrator and assayed again.

12.6 If an unknown sample has been diluted, correct for the appropriate dilution factor.

12.7 Values less than Calibrator 1 but greater than 0.7 pg/mL (assay sensitivity) may be calculated using the formula:

$$\text{Values of unknown} = \frac{\text{Corrected CPM (unknown)}}{\text{Corrected CPM (Cal. 1)}} \times \text{Value of Cal. 1}$$

TABLE I

N-tact PTH SP Sample Data

Tube	Duplicate CPM	Average CPM	Corrected CPM	Conc. (pg/mL)	B/T
Total Count	260,242 253,536	256,889			
0 Calibrator	384 374	379			
Calibrators (pg/mL)					
1 (15)	2,324 2,351	2,338	1,959		
2 (50)	6,469 6,630	6,550	6,171		
3 (150)	16,390 16,289	16,340	15,961		
4 (450)	34,605 35,246	34,926	34,547		
5 (2,000)	85,678 84,050	84,864	84,485		33%
Unknown Samples					
1	6,494 6,450	6,472	6,093	49	
2	34,144 34,932	34,538	34,159	442	

Typical sample data and a calibrator curve for intact PTH SP are shown in TABLE I and FIGURE 1; this information is for reference only and should not be used for the calculation of any value.

N-tact PTH SP SAMPLE CALIBRATOR CURVE

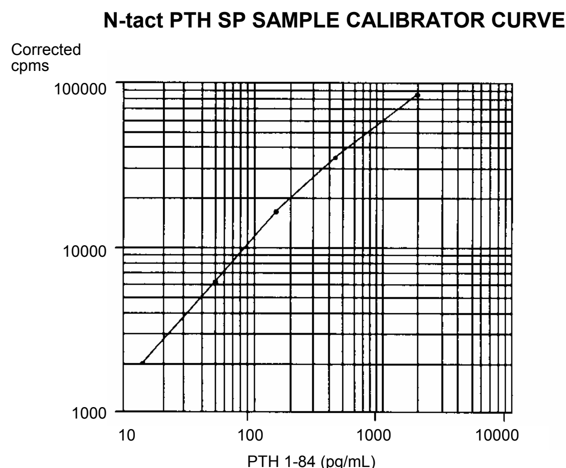


FIGURE 1

13. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

13.1 If the initial concentration of an unknown sample is greater than the highest calibrator, dilute with Calibrator 0 only.

13.2 Counting times should be sufficient to reduce statistical error (for example, accu-mulation of 2,000 CPM will yield 5% error; 10,000 CPM will yield 1% error).

REDUCTION DATA

The DiaSorin QC lab uses a smoothed spline curve fit.

14. EXPECTED VALUES

NORMAL RANGE

Each laboratory should establish its own normal range. A normal range has been estab-lished by DiaSorin using serum from 129 apparently healthy, fasting adults. The geo-metric mean was calculated to be 26 pg/mL with a 2 S.D. range of 13-54 pg/mL.

CLINICAL SPECIMENS

1. Serum samples from forty-six (46) patients with primary hyperparathyroidism were analyzed in the N-tact PTH SP assay system. Intact PTH values ranged from 43.6-686.1 pg/mL.
2. Fourteen (14) samples from patients diagnosed as having hypoparathyroidism were analyzed in the N-tact PTH SP assay system. Values for intact PTH ranged from 0-20.6 pg/mL.
3. Forty-eight patients (48) with chronic renal disease were analyzed in the N-tact PTH SP assay system. The intact PTH values ranged from 10.3-1042 pg/mL.
4. Four (4) samples for patients with familial hyperparathyroidism were analyzed in the N-tact PTH SP assay system. The intact PTH values ranged from 59.5-100.5 pg/mL.

15. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

15.1 Precision

Intra assay Variation (values = pg/mL). Three serum controls were run in replicates of 20 in a single assay to determine within assay variation.

Sample Number	Mean Value	S.D	%C.V.
1	26	0.9	3.6
2	276	5.4	2.0
3	1,125	27.5	2.4

Inter assay Variation (values = pg/mL). Three serum controls were run by 4 technicians in 20 separate assays to determine between assay variation.

Sample Number	Mean Value	S.D	%C.V.
1	49	1.6	3.4
2	285	13.1	4.6
3	1,111	54.8	4.9

15.2 Trueness: The assay trueness has been checked by the dilution test and the recovery test.

Parallelism

Serial Dilution Study of 3 Unknown Samples (values = pg/mL). (Samples diluted with 0 calibrator.)

Sample Number	Dilution	Measured	Corrected for dilution	% Obtained
1	Undiluted	164	-------	100%
	1:2	77	154	94%
	1:4	36	144	87%
	1:8	19	152	93%
2	Undiluted	286	-------	100%
	1:2	139	278	97%
	1:4	72	288	100%
	1:8	36	288	101%
3	Undiluted	750	-------	100%
	1:2	357	714	95%
	1:4	184	736	98%
	1:8	100	800	106%

ACCURACY

Recovery Study (values = pg/mL)

Background Value	Calibrator Added	Expected Value	Measured Value	Percent Recovery
Set No. 1				
24.3	50	74.3	77.9	107
24.3	150	174.3	186.3	108
24.3	450	474.3	464	98
Set No. 2				
17.7	50	67.7	69.5	104
17.7	150	167.7	177.6	107
17.7	450	467.7	471.7	101
Set No. 3				
19.5	50	69.5	72.4	106
19.5	150	169.5	179.4	107
19.5	450	469.5	461.2	98
Set No. 4				
10.6	50	60.6	60.4	100
10.6	150	160.6	163.9	102
10.6	450	460.6	435.8	94

15.3 Analytical Sensitivity

When defined as the apparent concentration at 2 standard deviations from the counts at minimum binding, the minimum detectable amount is 0.7 pg/mL.

15.4 Analytical Specificity

The cross-reactivity of the N-tact PTH SP system was made with the following human PTH fragments at 200,000 pg/mL.

Fragment	% Cross-reactivity
hPTH 39-84	<0.1
hPTH 53-84	<0.1
hPTH 39-68	<0.1
hPTH 44-68	<0.1
hPTH 1-34	<0.1
hPTH 13-34	<0.1
hPTH 1-84	100.0

REFER TO LAST PAGE FOR REFERENCES

SCHEME OF THE ASSAY

1. Reconstitute the lyophilized reagents and allow any frozen specimens to thaw completely. Keep reagents and thawed specimens on ice while setting up the assay.
2. Identify tubes in duplicate.
3. Dispense reagents according to the following scheme.

Tubes/Reagents	Total Counts	Cal 0-5	Control and unknown samples
Calibrators	-	200 µL	-
Controls	-	-	200 µL
Unknown samples	-	-	200 µL
Tracer	100 µL	100 µL	100 µL

4. Mix well.
5. Dispense 1 bead to all tubes.
6. Cover the tubes with parafilm, incubate for 22 hours (+/- 2 hours) at 20 – 25°C.
7. Aspirate the reaction mixture from each tube.
8. Wash the beads by vigorously dispensing 1 mL of wash solution into each tube with sufficient force to raise the bead from the bottom of the test tube. Aspirate wash solution. Repeat wash procedure 3 times.
9. Count each tube in a gamma counter.

DOSAGE RADIO-IMMUNOMETRIQUE DE L'HORMONE PARATHYROÏDIENNE N-TACT®

1. INDICATION

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO.

Cette trousse contient des instructions et des réactifs permettant d'effectuer la détermination quantitative, par dosage radio-immunométrique (IRMA), de l'hormone parathyroïdienne humaine intacte, biologiquement active (hPTH 1-84) dans le sérum ou le plasma.

2. RÉSUMÉ ET COMMENTAIRE

Le maintien d'une concentration appropriée de calcium dans les cellules et les liquides extracellulaires est d'une importance primordiale pour de nombreux processus biologiques ; l'hormone parathyroïdienne (PTH) est l'un des régulateurs les plus importants de l'homéostasie calcique.

Du point de vue clinique, la mesure de la PTH est effectuée parallèlement à celle de la calcémie pour évaluer les troubles du métabolisme du calcium.[1-3] La mesure de la PTH s'est révélée difficile en raison de l'hétérogénéité des peptides contenus à la fois dans la glande et dans le sang.[4]

La PTH est synthétisée dans les glandes parathyroïdes sous forme de précurseur formé de 115 acides animés, appelé hormone préproparathyroïdienne. Cette hormone est convertie en hormone proparathyroïdienne, forme intermédiaire de 90 acides aminés.[5] Un dernier processus protéolytique transforme l'hormone intermédiaire en PTH 1-84 biologiquement active.[6] Outre la fragmentation de l'hormone au niveau de la glande, la décomposition protéolytique de la PTH continue lors de sa libération dans le sang.[7, 8]

Des études scientifiques montrent que seuls la PTH intacte et les fragments du PTH contenant la séquence en acides aminés 1-34, sont actifs biologiquement. Des concentrations insignifiantes du(des) fragment(s) N-terminal (aux) entrent dans le capital circulant de l'hormone parathyroïdienne immunoréactive. Par conséquent, il est préférable de se référer à la mesure de la PTH intacte pour évaluer le métabolisme calcique des patients testés.[9-13]

L'hormone parathyroïdienne et ses fragments sont éliminés de la circulation par les reins et le foie.[14] La clairance des fragments C terminaux est plus lente que celle de l'hormone intacte et plus tributaire des mécanismes rénaux.[15] Chez les patients souffrant d'insuffisance rénale aiguë ou terminale, les fragments C terminaux présentent des concentrations très élevées. Le dosage de la PTH spécifique à C terminal peut révéler des concentrations élevées de PTH dues tout simplement à une clairance réduite de ces fragments biologiquement actifs, compliquant ainsi le diagnostic de l'hypercalcémie.[8,16-18]

3. DESCRIPTION DE LA METHODE DE DOSAGE

Le dosage radio-immunométrique (IRMA) de la PTH SP intacte de DiaSorin fait intervenir deux anticorps polyclonaux différents ayant été purifiés par chromatographie d'affinité. Ces anticorps sont spécifiques à deux parties différentes de la molécule de la PTH.

Le premier anticorps, spécifique de la PTH 39-84, est fixé à une phase solide (billes de polystyrène). Le deuxième, spécifique de la PTH 1-34, est marqué avec de l'iode 125. Des échantillons sont mis en incubation simultanément avec les deux anticorps. La PTH intacte 1-84 contenant les séquences d'acides aminés 1-34 et 39-84 est la seule forme de PTH qui sera fixée à la fois par l'anticorps de la bille et l'anticorps marqué avec l'iode 125.

Etant donné que l'anticorps fixé à la phase solide est spécifique aussi bien des fragments C terminaux et intermédiaires que de la PTH intacte, la phase solide a été conçue pour

fixer de très fortes concentrations de PTH. De ce fait, des concentrations très élevées de fragments PTH C-terminaux et intermédiaires n'interfèrent pas dans les échantillons à déterminer.

Après la période d'incubation, chaque bille est lavée pour éliminer tout anticorps marqué non lié. La radioactivité présente dans l'anticorps marqué lié est alors mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation gamma.

Les concentrations de PTH intacte des échantillons sont directement proportionnelles à la radioactivité mesurée.

4. RÉACTIFS FOURNIS DANS LA TROUSSE

Etalon 0 N-Tact PTH SP	1 flacon/15 mL
Etalons 1-5 N-Tact PTH SP	5 flacons/2 mL
Billes de N-Tact PTH SP	1 conteneur/100 billes
Anticorps N-Tact PTH SP ^{125}I	2 flacons/5 mL
Solution de lavage concentrée N-Tact PTH SP	1 flacon/ 50 mL
Sérums de contrôle N-Tact PTH SP	2 flacons/ 2 mL
Nombre de dosages	100

CONSERVATION : Dès réception, la trousse doit être stockée à une température comprise entre 2 et 8°C. Après ouverture, conserver chaque réactif entre 2 et 8° jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Les réactifs ne doivent pas être utilisés au-delà de la date de péremption. La date de péremption de la trousse se trouve sur l'étiquette extérieure et correspond à celle du traceur.

Pendant la reconstitution du contenu des tubes, agiter délicatement pour éviter la formation de mousse. Après utilisation, conserver tous les réactifs reconstitués à une température de -15°C ou à une température inférieure. Les réactifs de lots différents ne doivent pas être mélangés.

4.1 Etalons 0 N-tact PTH SP : réactif prêt à l'emploi
Contient du sérum humain avec 0,1% d'azide de sodium ajouté comme agent de conservation.

4.2 Etalons 1-5 N-tact PTH SP : réactif lyophilisé
Lot de 5 étalons PTH 1-84 humain à des concentrations nominales comprises entre 15-2000 pg/mL et contenant 0,1% d'azide de sodium et d'autres stabilisants. Les valeurs de ces concentrations exactes sont fournies avec chaque lot. Reconstituer chaque tube d'étalon lyophilisé avec 2 mL de l'étalon 0 fourni, mélanger en agitant et laisser reposer pendant 5 minutes à une température de 2-8° C ou jusqu'à dissolution complète du contenu. Les étalons de la trousse sont calibrés à l'aide de PTH humain synthétique. Les étalons de la trousse démontrent leur commutabilité avec les échantillons patients lorsqu'ils sont utilisés avec des réactifs et selon le mode d'emploi de ce dosage diagnostique in vitro, comme recommandé.

4.3 Billes N-tact PTH SP : réactif prêt pour l'emploi
Billes de polystyrène sont enduites d'un anticorps de chèvre purifié par affinité et spécifique de la séquence 39-84 de la PTH.

4.4 Anticorps ^{125}I N-tact PTH SP : réactif prêt à l'emploi
Chaque flacon contient 5 mL de l'anticorps de chèvre purifié par affinité spécifique de la PTH 1-34, marqué avec de l'iode 125. L'anticorps marqué est dilué dans un tampon de sérum contenant un colorant rouge et 0,1% d'azide de sodium.

4.5 Solution de lavage concentrée N-tact PTH SP : réactif en solution
Contient une solution concentrée d'agent de surface tamponné. Préparer une solution de lavage appropriée en diluant tout le contenu du flacon avec 450 mL d'eau distillée ou déminéralisée. Conserver la solution de bain à température ambiante.

4.6 Sérum de contrôle N-tact PTH SP (niveaux 1 et 2) : réactif lyophilisé
Sérum humain dopé avec hPTH 1-84 pour obtenir une concentration comprise dans l'intervalle spécifié. Ajout de 0,1% d'azide de sodium. Reconstituer chaque contrôle lyophilisé avec 2 mL d'eau distillée ou déminéralisée, mélanger et laisser reposer à 2-8°C jusqu'à dissolution complète du contenu. Les intervalles définis pour chaque lot figurent sur l'étiquette des flacons du sérum de contrôle.

5. AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO.
Non prévu pour une utilisation interne ou externe sur l'homme ou l'animal.

REACTIFS CONTENANT DES PRODUITS D'ORIGINE HUMAINE

Traiter comme potentiellement infectieux.
Chaque don de sérum/plasma intervenant dans la préparation de ce produit a été testé par une méthode agréée par la FDA et s'est avéré non réactif en présence de HBsAG, d'anticorps anti-VHC et d'anticorps anti-VIH1/2. Même si ces méthodes sont extrêmement précises, elles ne garantissent pas la détection de tous les dons infectés. Ce produit peut également contenir d'autres produits d'origine humaine pour lesquels il n'existe aucun test agréé. Comme aucune méthode de test connue ne peut offrir l'assurance complète de l'absence du virus de l'hépatite B (HBV) de l'hépatite C (HCV), du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou d'autres agents infectieux, tous les produits d'origine humaine doivent être manipulés conformément aux bonnes pratiques de laboratoire en prenant les précautions appropriées décrites dans le document U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4 mai 1999 ou dernière édition.

RÉACTIFS CONTENANT DE L'AZIDE DE SODIUM

ATTENTION : Certains réactifs de cette trousse contiennent de l'azide de sodium. L'azide de sodium peut réagir avec des installations sanitaires en plomb ou en cuivre et former des azides métalliques extrêmement explosives. Pour évacuer ces produits, rincer à grande eau afin d'éviter les accumulations d'azide. Pour plus d'informations, consulter "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," dans le manuel Guide-Safety Management No. CDC-22 publié par les Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA,.

Déclaration des risques relatifs aux substances dangereuses des communautés européennes (Directive du conseil 1999/45/EC)
R 20/21/22 - Nocif en cas d'inhalation, d'ingestion et de contact avec la peau.
R 32 - Un contact avec les acides dégage un gaz très toxique.
S28 - Après un contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau.

RÉACTIFS CONTENANT DE L'IODE 125

Cette trousse contient un produit radioactif dont l'activité ne dépasse pas 4µCi (148kBq) d'iode 125. Les précautions appropriées et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être utilisées pour la conservation, la manipulation et l'évacuation de ce produit.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence générale :

Ce produit radioactif peut être reçu, réceptionné, détenu et utilisé uniquement par des médecins, des laboratoires cliniques, des hôpitaux, des vétérinaires et des centres de recherche dans le cadre de la pratique de médecine vétérinaire, de laboratoires cliniques ou des hôpitaux, et uniquement pour des analyses cliniques ou de laboratoire in vitro n'impliquant pas l'administration interne ou externe du produit, ni par rayonnement, à l'homme ou à l'animal. Sa réception, son acquisition, sa détention, son utilisation et son

transfert sont sujets aux réglementations et à la licence générale de l'U.S. Nuclear Regulatory Commission de l'État avec lequel la Commission a conclu un accord pour l'exercice de l'autorité réglementaire.

1. Conserver le matériel radioactif dans un endroit réservé à cet effet.
2. L'accès aux produits radioactifs doit être limité au personnel autorisé uniquement.
3. Ne pipeter aucune solution radioactive avec la bouche.
4. Ne pas manger, ni boire dans des pièces où se trouvent des éléments radioactifs.
5. En cas d'éclaboussure de solutions radioactives dans une pièce, nettoyer la pièce, puis la laver à l'aide d'un produit détergent à base d'alcali ou d'une solution de décontamination radioactive. Tout article de verre utilisé doit être entièrement lavé à l'eau avant de laver les autres articles de verre du laboratoire.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence spécifique :
La réception, l'utilisation, le transfert et la mise au rebut de produits radioactifs sont sujets aux réglementations et conditions de votre licence spécifique.
Avertissement : Ce produit contient un produit chimique connu dans l'Etat de Californie comme étant cancérigène.

ATTENTION : La radioactivité imprimée sur la notice d'utilisation peut être légèrement différente de celle qui est imprimée sur l'étiquette de la boîte et sur l'étiquette du flacon du traceur. Les étiquettes de la boîte et du flacon du traceur indiquent la dose réelle de radioactivité à la date de calibrage, alors que la notice d'utilisation indique la radioactivité théorique de la trousse.

6. INDICATIONS D'UNE DÉTÉRIORATION POSSIBLE DES RÉACTIFS DE LA TROUSSE

6.1 Écart de pente ou de position de la courbe d'étalonnage par rapport à la normale obtenue.

6.2 Diminution de la liaison maximale.

6.3 Liaison non spécifique élevée.

6.4 Mauvaise reproductibilité des doublets

7. PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Deux cents (200) microlitres de sérum ou de plasma sur EDTA en double sont nécessaires pour effectuer le dosage N-tact PTH SP.

Du sérum ou du plasma humain peut être utilisé dans cette trousse. L'héparine peut être utilisée comme anticoagulant avec ce dosage. Un échantillon à jeun est recommandé, mais pas obligatoire. Prélever le sang de manière aseptique par ponction veineuse dans un tube de verre à vide de 5 ou 10 ml. Laisser le sang coaguler à température ambiante (15 à 25 °C). Centrifuger pendant 15 minutes à 760 x g* environ pour obtenir du sérum sans hémolyse. Aucun additif ou conservateur n'est requis pour maintenir l'intégrité de l'échantillon. Tous les plastiques, articles de verre ou autres produits entrant en contact avec l'échantillon ne doivent absolument pas être contaminés. Conserver les échantillons de sérum ou de plasma à -20°C maximum. Les échantillons peuvent être conservés dans des tubes en verre ou en plastique, à condition d'être hermétiquement fermés pour empêcher le dessèchement de l'échantillon.

Des échantillons de plasma EDTA et de sérum normaux ont été comparés par les laboratoires DiaSorin. Aucun changement significatif des valeurs n'a été observé.

*g = (1 118 x 10^{-8}) (rayon en cm) $(\text{tr/min})^2$

8. PROCÉDURE DE DOSAGE

8.1 Reconstituer les réactifs lyophilisés et permettre aux échantillons congelés de décongeler complètement. Maintenir les réactifs et les échantillons décongelés sur de la glace lors de la mise en place des éléments de dosage.

8.2 Préparer les tubes de verre borosilicaté de 12 x 75 mm numérotés en doublet conformément au processus de dosage.

8.3 Ajouter les réactifs dans les tubes comme suit :

- **a. Tubes de numération totale**
  100 µL de solution d'anticorps N-tact PTH SP ^{125}I (rouge)
- **b. Etalon 0**
  200 µL d'étalon 0
  100 µL de solution d'anticorps N-tact PTH SP ^{125}I (rouge)
- **c. Etalons (1-5)**
  200 µL d'étalon
  100 µL de solution d'anticorps N-tact PTH SP ^{125}I (rouge)
- **d. Contrôles et échantillons à déterminer**
  200 µL d'échantillon
  100 µL de solution d'anticorps N-tact PTH SP ^{125}I (rouge)

8.4 Agiter tous les tubes.

8.5 Déposer une bille dans chaque tube à l'aide de pinces recouvertes de téflon ou tout autre dispositif approprié à la manipulation des billes. (Ne pas utiliser les doigts.)

8.6 Couvrir les tubes à l'aide d'un parafilm ou équivalent.

8.7 Laisser incuber les tubes pendant 22 (±2) heures à 20-25°C.

8.8 Aspirer le mélange réactionnel de chaque tube.

8.9 Laver les billes en ajoutant 1 mL de solution de lavage dans chaque tube de manière à soulever la bille du fond du tube de test. Aspirer la solution de lavage. Répéter l'opération 3 fois.

8.10 Mesurer la radioactivité de chaque tube à l'aide d'un compteur de scintillation gamma.

9. MATÉRIEL ET PRODUITS REQUIS MAIS NON FOURNIS

9.1 Tubes en verre borosilicaté jetables, 12 x 75 mm.

9.2 Portoir.

9.3 Compteur gamma pouvant mesurer l'iode 125.

9.4 Vortex.

9.5 Dispositifs de pipetage

- **a.** Micropipette graduée pour distribuer 200 µL.
- **b.** Distributeurs à répétition gradués pour distribuer 100 µL et 1 mL.
- **c.** Pipettes volumétriques pour la reconstitution des contrôles et étalons.

9.6 Parafilm ou équivalent pour couvrir les tubes.

9.7 Pinces recouvertes de téflon ou tout autre dispositif agréé pour la trousse pour la manipulation des billes.

9.8 Pompe à vide pour éliminer la solution à anticorps marquée avec l'iode ^{125}I et la solution de lavage.

*g = (1 118 x 10^{-8}) (rayon en cm) (tr/min)^2

10. COMMENTAIRES SUR LA PROCÉDURE

10.1 Lors de l'ajout des billes dans les tubes, incliner légèrement le portoir et laisser les billes rouler au fond du tube. On évitera ainsi les éclaboussures de la solution à doser. Ne pas manipuler les billes avec les doigts.

10.2 Pipeter l'anticorps marqué à l'iode ^{125}I dans le premier tiers inférieur du tube de dosage.

10.3 Pour surveiller complètement la précision constance d'un dosage RIA, le laboratoire doit parfois vérifier d'autres facteurs. DiaSorin recommande une vérification régulière des paramètres suivants pour s'assurer de la cohérence des résultats de la trousse.

a. Activité totale

b. Liaison maximale
Coups par minute (CPM) du tube d'étalonnage 2000

c. Liaison non spécifique
CPM du tube d'étalonnage 0

11. CONTRÔLE QUALITÉ

Pour chaque dosage, le laboratoire doit utiliser les deux sérums de contrôle de la trousse pour s'assurer de la validité des résultats du dosage. Déterminer ensuite la moyenne et l'écart-type pour chaque sérum de contrôle, sur un minimum de dix (10) dosages. Une gamme de valeurs acceptable peut donc être obtenue pour ces sérums en utilisant l'intervalle ±2 écart-type par rapport aux valeurs précédemment calculées. Le laboratoire de contrôle qualité de DiaSorin a déterminé un intervalle des valeurs pour les contrôles de la trousse.

12. CALCUL DES RÉSULTATS

Pour déterminer la concentration de PTH intact dans les échantillons à déterminer et les échantillons de contrôle, on prépare une courbe d'échantillonnage en se servant des concentrations des étalons inscrites sur les étiquettes des flacons. Les valeurs sont obtenues comme suit :

12.1 Calculer la moyenne des CPM des étalons, contrôles et échantillons à déterminer.

12.2 Soustraire la moyenne des CPM des tubes de l'étalon 0 de toutes les moyennes de CPM pour obtenir des CPM corrigés.

12.3 Sur une feuille de papier bilogarithmique, porter en ordonnée les CPM corrigés de chaque étalon et en abscisse la concentration des étalons.

12.4 Interpoler les concentrations de PTH des échantillons à partir du tracé de la courbe d'étalonnage.

12.5 Si un échantillon à déterminer est supérieur à l'étalon le plus élevé, il doit être dilué avec l'étalon 0 et dosé de nouveau.

12.6 Si un échantillon à déterminer a été dilué, corriger sa valeur avec le facteur de dilution approprié.

12.7 Les valeurs inférieures à l'étalon 1, mais supérieure à 0,7 pg/mL (sensibilité du dosage) peuvent être calculées à partir de la formule suivante :

$$\text{Valeurs à déterminer} = \frac{\text{CPM corrigé (à déterminer)}}{\text{CPM corrigé (Étalon 1)}} \times \text{Valeur de l'étalon 1}$$

TABLE I
Données du dosage N-tact PTH SP

Tube	Doublet CPM	Moyenne CPM	Corrigé CPM	Conc. (pg/mL)	B/T
Activité totale	260 242 253,536	256 889			
Etalon 0	384 374	379			
Etalons (pg/mL)					
1 (15)	2 324 2,351	2 338	1 959		
2 (50)	6 469 6,630	6 550	6 171		
3 (150)	16 390 16,289	16 340	15 961		
4 (450)	34 605 35,246	34 926	34 547		
5 (2 000) 84 050	85 678	84 864	84 485		33%
Échantillons à déterminer					
1	6 494 6,450	6 472	6 093	49	
2	34 144 34,932	34 538	34 159	442	

Les données types et une courbe d'étalonnage pour la PTH SP intacte sont présentées dans le TABLEAU I et dans la FIGURE 1 ; ces informations ne sont données qu'à titre de référence et ne doivent pas être utilisées pour le calcul d'une valeur.

COURBE D'ETALONNAGE N-tact PTH SP

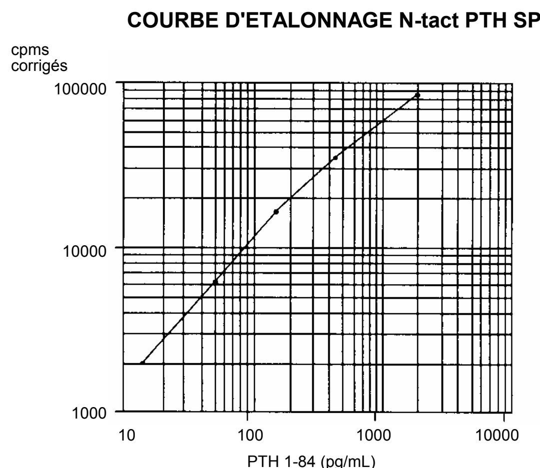


FIGURE 1

13. LIMITES DU DOSAGE

13.1 Si la concentration initiale d'un échantillon à déterminer est supérieure à la valeur de l'étalon le plus haut, le diluer avec l'étalon 0 uniquement.

13.2 Les temps de comptage doivent être suffisants pour réduire les erreurs de statistiques (par exemple, 2 000 CPM comporteront 5% d'erreur ; 10 000 CPM 1% d'erreur).

TRAITEMENT DES RESULTATS

Le laboratoire QC DiaSorin utilise un programme "smoothed spline curve".

14. VALEURS DE REFERENCE

VALEURS NORMALES

Chaque laboratoire doit établir sa propre plage de valeurs de référence. DiaSorin a établi la sienne en utilisant le sérum de 129 adultes à jeun et apparemment en bonne santé. La moyenne calculée était de 26 pg/mL avec un écart de 2 S.D. allant de 13 à 54 pg/mL.

ECHANTILLONS CLINIQUES

1. Les échantillons de sérum de quarante six (46) patients avec une hyperparathyroïdie primaire ont été analysés suivant le système de dosage N-tact PTH SP. Les valeurs de PTH intacte varient de 43,6-à 686,1 pg/mL.
2. Quatorze (14) échantillons de patients diagnostiqués comme ayant une hypoparathyroïdie ont été analysés suivant le système de dosage N-tact PTH SP. Les valeurs de PTH intacte varient de 0 à 20,6 pg/mL.
3. Quarante huit (48) patients avec une maladie rénale chronique ont été analysés suivant le système de dosage N-tact PTH SP. Les valeurs de PTH intacte varient de 10,3 à 1042 pg/mL.
4. Quatre (4) échantillons de patients avec une hyperparathyroïdie héréditaire ont été analysés suivant le système de dosage N-tact PTH SP. Les valeurs de PTH intacte varient de 59,5 à 100,5 pg/mL.

15. CRITERES DE QUALITE

15.1 Précision

Variation intra-essai (valeurs = pg/mL). Trois sérums de contrôle ont été dosés 20 fois dans une même série pour déterminer les variations de dosage.

Numéro d'échantillon	Valeur moyenne	Ecart-type	(% C.V.)
1	26	0.9	3.6
2	276	5.4	2.0
3	1,125	27.5	2.4

Variation inter-essai (valeurs = pg/mL). Trois sérums de contrôle ont été traités par 4 techniciens dans 20 dosages différents pour déterminer les variations entre les différentes séries de dosage.

Numéro d'échantillon	Valeur moyenne	Ecart-type	(% C.V.)
1	49	1.6	3.4
2	285	13.1	4.6
3	1,111	54.8	4.9

15.2 Exactitude : l'exactitude du dosage a été vérifiée par les tests de dilution et de récupération.

Parallélisme

Etude de dilutions en série de 3 échantillons à déterminer (valeurs = pg/mL). (Echantillons dilués avec étalon 0.)

Numéro d'échantillon	Dilution	Mesuré	Valeur corrigée	% obtenu
1	Non dilué	164	-------	100%
	1:2	77	154	94%
	1:4	36	144	87%
	1:8	19	152	93%
2	Non dilué	286	-------	100%
	1:2	139	278	97%
	1:4	72	288	100%
	1:8	36	288	101%
3	Non dilué	750	-------	100%
	1:2	357	714	95%
	1:4	184	736	98%
	1:8	100	800	106%

EXACTITUDE

Etude de la récupération (valeurs = pg/mL)

Valeur de référence	Etalon ajouté	Valeur attendue	Valeur mesurée	Pourcentage de récupération
Lot N° 1				
24.3	50	74.3	77.9	107
24.3	150	174.3	186.3	108
24.3	450	474.3	464	98
Lot N° 2				
17.7	50	67.7	69.5	104
17.7	150	167.7	177.6	107
17.7	450	467.7	471.7	101
Lot N° 3				
19.5	50	69.5	72.4	106
19.5	150	169.5	179.4	107
19.5	450	469.5	461.2	98
Lot N° 4				
10.6	50	60.6	60.4	100
10.6	150	160.6	163.9	102
10.6	450	460.6	435.8	94

15.3 Sensibilité analytique

Définie comme la concentration obtenue à 2 écarts-types de l'activité de liaison minimale, la quantité minimale décelable est de 0,7 pg/mL.

15.4 Spécificité analytique

La réaction croisée du système N-tact PTH SP a été évaluée à l'aide des fragments de PTH humaine suivants à 200 000 pg/mL.

Fragment	**% réaction croisée**
hPTH 39-84	<0,1
hPTH 53-84	<0,1
hPTH 39-68	<0,1
hPTH 44-68	<0,1
hPTH 1-34	<0,1
hPTH 13-34	<0,1
hPTH 1-84	100

VOIR LA DERNIÈRE PAGE POUR RÉFÉRENCE

PROCEDURE DE DOSAGE

1. Reconstituer les réactifs lyophilisés et permettre aux échantillons congelés de décongeler complètement. Maintenir les réactifs et les échantillons décongelés sur de la glace lors de la mise en place des éléments de dosage.
2. Identifier les tubes en double.
3. Ajouter les réactifs dans les tubes comme suit :

Tubes/réactifs	Tubes de numération totale	Etalons 0-5	Contrôles et échantillons à déterminer
Étalons	-	200 µL	-
Contrôles	-	-	200 µL
Échantillons à déterminer	-	-	200 µL
Traceur	100 µL	100 µL	100 µL

4. Bien agiter tous les tubes.
5. Déposer une bille dans tous les tubes.
6. Couvrir les tubes avec un parafilm et laisser incuber pendant 22 heures (+/- 2 heures) à 20 - 25°C.
7. Aspirer le mélange réactionnel de chaque tube.
8. Laver les billes en ajoutant 1 mL de solution de lavage dans chaque tube de manière à soulever la bille du fond du tube de test. Aspirer la solution de lavage. Répéter l'opération 3 fois.
9. Mesurer la radioactivité de chaque tube à l'aide d'un compteur à scintillation gamma.

N-TACT® PARATHORMON IMMUNORADIOMETRIE-ASSAY

1. VERWENDUNGSZWECK

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

Diese Packung enthält Anleitungen und Material für die quantitative Bestimmung von biologisch aktivem, intaktem Human-Parathormon (hPTH 1-84) in Serum oder Plasma mit dem Immunoradiometrie-Assay (IRMA).

2. ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Die Aufrechterhaltung eines korrekten Kalziumspiegels in Zellen und extrazellulären Flüssigkeiten ist von grundlegender Bedeutung bei zahlreichen biologischen Vorgängen. Das Parathormon (PTH) gehört zu den wichtigsten Regulatoren der Kalziumhomöostase.

Im klinischen Bereich wird die PTH-Messung in Verbindung mit Kalziumbestimmungen verwendet, um Störungen des Kalziumhaushaltes zu beurteilen.[1-3] Aufgrund der Heterogenität der Peptide, die sowohl in der Drüse als auch im Blutkreislauf auftreten, ist die Messung von PTH mit Schwierigkeiten verbunden.[4] PTH wird in den Nebenschilddrüsen als ein Vorläufer der 115-Aminosäure als Präproparathormon aufgebaut und in eine 90-Aminosäure-Zwischenform, das Proparathormon, umgewandelt.[5] Ein weiterer proteolytischer Vorgang wandelt das Zwischenhormon in biologisch aktives PTH 1-84 um.[6] Zusätzlich zur Bildung von Fragmenten in der Drüse erfolgt ein weiterer proteolytischer Abbau von PTH, wenn es in den Kreislauf ausgeschüttet wird.[7, 8]

Wissenschaftliche Untersuchungen weisen darauf hin, dass nur intaktes PTH und PTH-Fragmente mit der Aminosäuresequenz 1-34 biologisch aktiv sind. Geringfügige Konzentrationen des/der N-terminalen Fragmentes/e tragen zum zirkulierenden Pool des immunreaktiven Parathormons bei. Daher ist bei Verwendung des PTH-Spiegels zur Diagnosestellung die Messung von intaktem PTH der beste Hinweis auf den Zustand des Kalziumhaushaltes.[9-13]

Das Parathormon und seine Fragmente werden durch Nieren und Leber aus dem Kreislauf ausgeschieden.[14] Die Ausscheidung der C-terminalen Fragmente erfolgt langsamer als die Ausscheidung des intakten Hormons und ist stärker von der Nierenfunktion abhängig.[15] Bei Patienten mit schweren Nierenstörungen bzw. Niereninsuffizienz im Endstadium sammeln sich die C-terminalen Fragmente in sehr großen Mengen an. Bei Anwendung eines für die C-terminalen Fragmente spezifischen PTH-Assays können erhöhte PTH-Konzentrationen einfach auf Grund reduzierter Ausstoßung dieser biologisch inaktiven Fragmente festgestellt werden, wodurch die Bestimmung von Hyperkalzämie sehr erschwert wird.[8,16-18]

3. TESTPRINZIP

Beim DiaSorin Intakt-PTH-SP-Immunoradiometrie-Assay (IRMA) kommen 2 verschiedene polyklonale, durch Affinitätschromatographie gereinigte Antikörper zur Anwendung. Diese gereinigten Antikörper sind für 2 verschiedene Bereiche des PTH-Moleküls spezifisch.

Der erste für PTH 39-84 spezifische Antikörper ist an eine feste Phase (Polystyrol-Kügelchen) gebunden, wogegen der zweite Antikörper für PTH 1-34 spezifisch und mit Jod-125 markiert ist. Die Proben werden gleichzeitig mit beiden Antikörpern inkubiert. Intaktes PTH 1-84 enthält Aminosäuresequenzen 1-34 und 39-84 und ist die einzige Form, in der PTH sowohl durch den Antikörper auf dem Kügelchen als auch durch den mit Jod-125 markierten Antikörper gebunden wird.

Da der an die feste Phase gebundene Antikörper sowohl für C-terminale und Mittelbereichfragmente als auch für intaktes PTH spezifisch ist, wurde die Aufnahmefähigkeit der festen Phase groß genug für sehr hohe PTH-Spiegel konzipiert. Dies verhindert eine Interferenz durch extrem große Mengen von C-terminalen und Mittelbereich-PTH-Fragmenten in unbekannten Proben.

Nach der Inkubation wird jedes Kügelchen gewaschen, um alle ungebundenen markierten Antikörper zu entfernen. Die im verbleibenden gebundenen, markierten Antikörper vorhandene Radioaktivität wird anschließend mit einem Gammamesser gemessen.

Die Konzentrationen von intaktem PTH in den Proben sind direkt proportional zur gemessenen Radioaktivität.

4. KITREAGENZIEN

N-Tact PTH SP Kalibrator 0 N-Tact PTH SP Kalibratoren 1-5 N-Tact PTH SP Kügelchen ^{125}I N-Tact PTH SP Antikörper N-Tact PTH SP Waschlösungskonzentrat N-Tact PTH SP Kontrollen	1 Fläschchen/15 ml 5 Fläschchen/2,0 ml 1 Behälter/100 Kügelchen 2 Fläschchen/5 ml 1 Fläschchen/ 50 ml 2 Fläschchen/ 2,0 ml
Anzahl der Tests	100

LAGERUNG: Das Kit sollte bei 2-8°C aufbewahrt werden. Nach dem Öffnen jedes Reagenz bei 2-8°C nicht länger als bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum lagern. Die Reagenzien dürfen nach dem Verfallsdatum nicht verwendet werden. Das Verfallsdatum des Kits ist auf dem äußeren Etikett angebracht und entspricht dem Verfallsdatum des Tracers.

Bei der Rekonstitution den Inhalt der Fläschchen vorsichtig mischen, um Schaumbildung zu vermeiden. Alle rekonstituierten Reagenzien sofort nach Gebrauch bei -15°C oder darunter lagern. Reagenzien aus verschiedenen Chargen dürfen nicht vermischt werden.

4.1 N-tact PTH SP Kalibrator 0: gebrauchsfertiges Reagenz
Enthält Humanserum mit 0,1 % Natriumazid als Konservierungsmittel.

4.2 N-tact PTH SP Kalibratoren 1-5: lyophilisiertes Reagenz
Satz von 5 Human-PTH-1-84-Kalibratoren in Nominalkonzentrationen von 15-2000 pg/ml, enthält 0,1 % Natriumazid und andere Stabilisatoren. Jeder Charge sind genaue Konzentrationswerte zugeteilt. Jedes Fläschchen lyophilisierten Kalibrator mit 2,0 ml des mitgelieferten 0-Kalibrators rekonstituieren, durch Umrühren mischen und 5 Minuten bzw. bis zur kompletten Lösung des Inhalts 2-8°C stehen lassen. Die Kitkalibratoren wurden mit synthetischem Human-PTH kalibriert. Die Kitkalibratoren sind mit Patientenproben austauschbar, wenn sie mit Reagenzien verwendet werden und dieser diagnostische In-vitro-Test wie empfohlen durchgeführt wird.

4.3 N-tact PTH SP Kügelchen: gebrauchsfertiges Reagenz
Polystyrolkügelchen sind mit affinitätschromatographisch gereinigtem, für die 39-84-Sequenz von PTH spezifischen Ziegenantikörper beschichtet.

4.4 ^{125}I N-tact PTH SP Antikörper: gebrauchsfertiges Reagenz
Jedes Fläschchen enthält 5,0 ml affinitätschromatographisch gereinigte, für PTH 1-34 spezifischen und mit Jod-125 markierten Ziegenantikörper. Der markierte Antikörper ist in gepuffertem Serum mit rotem Farbstoff 0,1 % Natriumazid verdünnt.

4.5 N-tact PTH SP Waschlösungskonzentrat: Reagenz in Lösung
Enthält ein konzentriertes, gepuffertes Tensid. Zur Zubereitung der Arbeitswaschlösung den gesamten Fläschcheninhalt mit 450 ml destilliertem oder entionisiertem Wasser verdünnen. Arbeitswaschlösung bei Raumtemperatur aufbewahren.

4.6 N-tact PTH SP Kontrolle, Stufe 1 und Stufe 2: lyophilisiertes Reagenz
Humanserum ist mit hPTH 1-84 gespickt, um eine Konzentration innerhalb eines bestimmten Bereichs zu erzielen. Zugabe von 0,1 % Natriumazid. Jede lyophilisierte Kontrolle mit 2,0 ml destilliertem oder entionisiertem Wasser verdünnen, mischen und bei 2-8°C bis zur vollständigen Lösung des Inhalts stehen lassen. Die Werte für die einzelnen Chargen sind auf den Kontrollfläschchen aufgedruckt.

5. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK
Nicht für internen oder externen Gebrauch bei Menschen oder Tieren.

REAGENZIEN MIT MATERIAL HUMANEN URSPRUNGS

Dieses Produkt ist als potenzieller Infektionserreger zu behandeln.

Alle in der Herstellung dieses Produktes verwendeten Serum- bzw. Plasmaspendeeinheiten wurden nach einer von der FDA (Food and Drug Administration, US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel) genehmigten Methode getestet und für nicht reaktiv auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg), Hepatitis-C-Antikörper (HCV) und Antikörper für HIV-1/2 befunden. Obwohl diese Methode äußerst genau ist, bietet sie keine Gewähr dafür, dass alle infizierten Einheiten identifiziert werden können. Dieses Produkt kann auch Material humanen Ursprungs enthalten, für welches es noch kein genehmigtes Testverfahren gibt. Da keine der zur Zeit bekannten Testmethoden absolute Gewähr für die Abwesenheit des Hepatits-B-Virus (HBV), Hepatitis-C-Virus (HCV), des Retrovirus (HIV) oder anderer Infektionserreger bieten kann, sind alle Produkte mit Komponenten humanen Ursprungs unter Einhaltung guter Laborpraktiken und entsprechender Vorsichtsmaßnahmen laut Empfehlungen des Leitfadens der Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health (amerikanische Krankheitsforschungszentren/Staatliche Gesundheitsinstitute): “Biosafety in Micro-biological and Biomedical Laboratories” (Biosicherheit in mikrobiologischen und biomedizinischen Laboren), 4. Auflage, Mai 1999, oder aktuelle Auflage, als potenzielle infektiöse Substanzen zu behandeln.

REAGENZIEN MIT NATRIUMAZID

VORSICHT: Diese Packung enthält Reagenzien mit Natriumazid, das gegebenenfalls mit Blei- oder Kupferleitungen reagieren und höchst explosive Metallazide bilden kann. Zur Entsorgung mit reichlichst Wasser nachspülen, um Azidaufbau zu vermeiden. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt “Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts” (Dekontaminierung von Abflüssen in Laborspülbecken zur Entsorgung von Azidsalzen) des Handbuches "Safety Management" (Sicherheitsmaßnahmen), Nr. CDC-22, herausgegeben von Centers for Disease Control and Prevention (US-Krankheitsforschungszentren), Atlanta, Bundesstaat Georgia, 1976.

Europäische Gemeinschaften: Gefahrenbezeichnungen für gefährliche Stoffe (Richtlinie 1999/45/EG)
R 20/21/22 - Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
R 32 - Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.
S28 - Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen.

REAGENZIEN MIT JOD-125

Diese Packung enthält radioaktives Material mit maximal 20 µCi (740 kBq) Jod-125. Bei der Lagerung, Handhabung und Entsorgung dieses Materials sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen und gute Laborpraktiken einzuhalten.

Für Ärzte bzw. Institutionen, welche im Rahmen einer Generallizenz Radioisotope erhalten: Entgegennahme, Erwerb, Besitz und Verwendung dieses radioaktiven Materials sind nur Ärzten, veterinärmedizinisch tätigen Tierärzten, klinischen Laboren oder Krankenhäusern und nur für klinische In-vitro-Tests oder In-vitro-Labortests gestattet, bei denen kein interner oder externer Kontakt des Materials oder seiner Strahlung mit Menschen oder Tieren stattfindet. Entgegennahme, Erwerb, Besitz, Verwendung und Weitergabe des Materials unterliegen den Vorschriften und der Generallizenz der US Nuclear Regulatory Commission (US-amerikanische Strahlenschutzbehörde) bzw. des Staates, mit dem diese Behörde ein Abkommen zur Ausübung ihrer Überwachungsfunktion abgeschlossen hat.

1. Die Lagerung des radioaktiven Materials ist auf einen speziell dafür bestimmten Bereich zu beschränken.
2. Der Zugang zu radioaktivem Material ist nur befugten Personen zu gestatten.
3. Radioaktives Material nicht mit dem Mund pipettieren.
4. Im vorgesehenen radioaktiven Arbeitsbereich nicht essen oder trinken.
5. Verschüttetes Material aufwischen und Bereich anschließend mit alkalischem Reinigungsmittel oder radiologischer Dekontaminationslösung waschen.
   Alle benutzten Glasbehälter vor dem Waschen mit anderen Laborbehältern aus Glas gründlichst mit Wasser spülen.

Für Ärzte oder Einrichtungen, die im Rahmen einer Sondergenehmigung Radioisotope erhalten:

Entgegennahme, Gebrauch, Weitergabe und Entsorgung radioaktiven Materials unterliegen den Vorschriften und Bedingungen der jeweiligen Sondergenehmigung.

WARNHINWEIS: Dieses Produkt enthält eine Chemikalie, die nach Angaben des US-Bundesstaates Kalifornien krebserregend ist.

ACHTUNG: Die auf der Packungsbeilage angegebene Radioaktivität kann von der auf dem Etikett des Kartons und des Tracer-Fläschchens angegebenen etwas abweichen. Sowohl das Etikett des Kartons als auch das Etikett des Tracer-Fläschchens geben den tatsächlichen Wert der Radioaktivität am Kalibrationsdatum an, während die Packungsbeilage die theoretische Radioaktivität darstellt.

6. ANZEICHEN FÜR MÖGLICHEN VERFALL DER KITREAGENZIEN

6.1 Eine Veränderung im Grad oder Verlauf der Eichkurve im Vergleich zu den gewöhnlich erzielten Ergebnissen.

6.2 Eine Verringerung der maximalen Bindung.

6.3 Eine hohe nichtspezifische Bindung.

6.4 Geringe Duplikatwerte.

7. PROBENGEWINNUNG UND -VORBEREITUNG

Für den N-tact-PTH-SP-Assay werden zweihundert Mikroliter Serum oder EDTA-Plasma im Duplikat benötigt.

In diesem Kit kann humanes Serum oder Plasma verwendet werden. Bei diesem Test kann das Antikoagulans EDTA verwendet werden. Nüchternproben werden empfohlen, sie sind jedoch nicht erforderlich. Blut unter aseptischen Bedingungen durch Venenpunktion in ein 5- oder 10-ml-Glasröhrchen aufnehmen. Blut bei Raumtemperatur (15-25°C) gerinnen lassen. Zur Gewinnung von hämolysefreiem Serum Blutproben 15 Minuten lang mit ca. 760 x g* zentrifugieren. Zur Aufrechterhaltung der Probenreinheit sind weder Zusatzstoffe noch Konservierungsmittel erforderlich. Alle mit der Probe in Kontakt gekommenen Kunststoffbehälter, Glasbehälter oder anderen Materialien sind von jeder Verunreinigung freizuhalten. Serum- oder Plasmaproben bei -20°C oder darunter lagern. Die Proben können in Glas- oder Kunststofffläschchen gelagert werden, wenn die Fläschchen fest versiegelt sind, um eine Austrocknung der Probe zu vermeiden.

Normale EDTA-Plasma- und Serumproben wurden in den DiaSorin-Laboren verglichen. Es wurden keine signifikanten Wertunterschiede festgestellt.

8. TESTABLAUF

8.1 Lyophilisierte Reagenzien rekonstituieren und gefrorene Proben vollständig auftauen lassen. Reagenzien und aufgetaute Proben während der Testvorbereitungen auf Eis belassen.

8.2 Beschriftete 12 x 75 mm Borsilikat-Glasröhrchen in doppelter Anordnung laut Testschema aufstellen.

8.3 Reagenzien den Röhrchen wie folgt zugeben:

- **a. Totalaktivität-Röhrchen**
  100 µl ^{125}I N-tact PTH SP Antikörper (rot)
- **b. 0-Kalibrator**
  200 µl 0-Kalibrator
  100 µl ^{125}I N-tact PTH SP Antikörper (rot)
- **c. Kalibratoren (1-5)**
  200 µl Kalibrator
  100 µl ^{125}I N-tact PTH SP Antikörper (rot)
- **d. Kontrollen und unbekannte Proben**
  200 µl Probe
  100 µl ^{125}I N-tact PTH SP Antikörper (rot)

8.4 Alle Röhrchen auf dem Vortex mischen.

8.5 Mit der teflonüberzogenen Pinzette oder anderem geeignetem Instrument zur Abgabe von Kügelchen in jedes Röhrchen ein Kügelchen geben (nicht die Finger verwenden).

8.6 Röhrchen mit Parafilm oder gleichwertigem Material abdecken.

8.7 Röhrchen bei 20-25°C 22 (±2) Stunden inkubieren.

8.8 Reaktionsmischung aus jedem Röhrchen absaugen.

8.9 Kügelchen waschen. Dazu 1 ml Waschlösung mit so viel Kraft in jedes Röhrchen einfüllen, dass das Kügelchen vom Boden des Teströhrchens hochgehoben wird. Waschlösung absaugen. Diesen Waschvorgang dreimal durchführen.

8.10 Die in jedem Röhrchen vorhandene Radioaktivität mit dem Gammamesser messen.

*g = (1118 x 10^{-8}) (Radius in cm) $(U/min)^2$

9. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND MATERIALIEN

9.1 Einweg-Borsilikat-Glasröhrchen, 12 x 75 mm

9.2 Röhrchenständer

9.3 Gammamesser zur Messung von Jod-125

9.4 Vibrationsmischer (Vortex)

9.5 Pipettiergeräte:

- **a.** Mikropipettierer mit Einstellungen zur Abgabe von 200 µl
- **b.** Multipipetten mit Einstellungen zur Abgabe von 100 µl und 1 ml
- **c.** Messpipetten zur Rekonstitution von Kontroll- und Standardproben

9.6 Parafilm oder gleichwertige Abdeckung für Teströhrchen

9.7 Teflonüberzogene Pinzette oder anderes packungszulässiges Instrument zur Abgabe der Kügelchen

9.8 Aspirationsgerät zum Absaugen des ^{125}I-Antikörpers und der Waschlösung

10. ANMERKUNGEN ZUM VERFAHREN

10.1 Bei der Zugabe der Kügelchen in die Teströhrchen den Röhrchenständer etwas neigen und die Kügelchen in die Röhrchen hineinrollen lassen. Dadurch wird übermäßiges Verspritzen der Testlösung vermieden. Kügelchen nicht mit den Fingern berühren.

10.2 Den ^{125}I-Antikörper in das untere Drittel des Teströhrchens pipettieren.

10.3 Für eine komplette Laborkontrolle des beständigen Verhaltens eines RIA sind zusätzliche Faktoren zu berücksichtigen. DiaSorin empfiehlt bei jedem Assay eine regelmäßige Überprüfung der folgenden Parameter zur Gewährleistung einheitlicher Resultate.

a. Totalaktivität

b. Maximale Bindung
I/M (Impulse pro Minute) des Röhrchens mit 2000-Kalibrator

c. Nichtspezifische Bindung
I/M des 0-Kalibrators

11. QUALITÄTSKONTROLLE

Jedem Labor wird empfohlen, bei jedem Assay beide Packungskontrollseren mitzutesten, um die Gültigkeit aller Testergebnisse zu gewährleisten. Ein Mittelwert und eine Standardabweichung sind dann für jede Kontrolle in mindestens zehn (10) Versuchsgängen zu bestimmen. Ein zulässiger Wertbereich kann dann für diese Kontrollen mit ±2 Standardabweichungen der zuvor bestimmten Werte ermittelt werden. Das Qualitätskontrolllabor von DiaSorin hat für die in dieser Packung enthaltenen Kontrollen einen Bereich ermittelt.

12. ERGEBNISBERECHNUNG

Zur Bestimmung der Konzentration von intaktem PTH in unbekannten Proben und Kontrollproben wird eine Eichkurve mit den auf dem Fläschchenetikett angegebenen Kalibratorkonzentrationen erstellt. Die Werte werden wie folgt ermittelt:

12.1 Den durchschnittlichen I/M-Wert für jede Kalibrator-, Kontroll- und unbekannte Probe errechnen.

12.2 Den durchschnittlichen I/M-Wert der 0-Kalibrator-Röhrchen von allen anderen Durchschnittsmessungen subtrahieren, um die korrigierten I/M-Werte zu erzielen.

12.3 Auf logarithmischem Millimeterpapier den berichtigten I/M-Wert jeder Kalibratorstufe auf der Ordinate gegen die Kalibratorkonzentration auf der Abszisse auftragen.

12.4 Die PTH-Mengen in den Proben aus dem Kurvendiagramm interpolieren.

12.5 Wenn die Werte einer unbekannten Probe größer sind als die größten Kalibratorwerte, ist die unbekannte Probe entsprechend mit 0-Kalibrator zu verdünnen und neu zu testen.

12.6 Wenn eine unbekannte Probe verdünnt wurde, ist mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor zu berichtigen.

12.7 Werte, die kleiner als Kalibrator 1, aber größer als 0,7 pg/ml (Sensitivität des Assays) sind, können mit folgender Gleichung berechnet werden:

$$\text{Werte der unbek. Probe} = \frac{\text{korrigierter I/M-Wert (unbek. Probe)}}{\text{korrigierter I/M-Wert (Kal. 1)}} \text{ x Wert von Kal. 1}$$

TABELLE I
N-tact-PTH-SP-Datenbeispiel

Röhrchen	Doppelbest. I/M	Durchschn. I/M	Korrig. I/M	Konz. (pg/ml)	B/T
Totalaktivität	260242 253,536	256889			
0-Kalibrator	384 374	379			
Kalibratoren (pg/ml)					
1 (15)	2 324 2 351	2 338	1 959		
2 (50)	6 469 6 630	6 550	6 171		
3 (150)	16 390 16 289	16 340	15 961		
4 (450)	34 605 35 246	34 926	34 547		
5 (2 000) 84 050	85 678	84 864	84 485		33%
Unbekannte Proben					
1	6 494 6 450	6 472	6 093	49	
2	34 144 34 932	34 538	34 159	442	

TABELLE I und ABBILDUNG 1 zeigen typische Probendaten und eine Eichkurve für intaktes PTH-SP; diese Angaben dienen nur als Beispiel und sind nicht für die Berechnung von Werten zu verwenden.

BEISPIEL EINER N-tact-PTH-SP-EICHKURVE

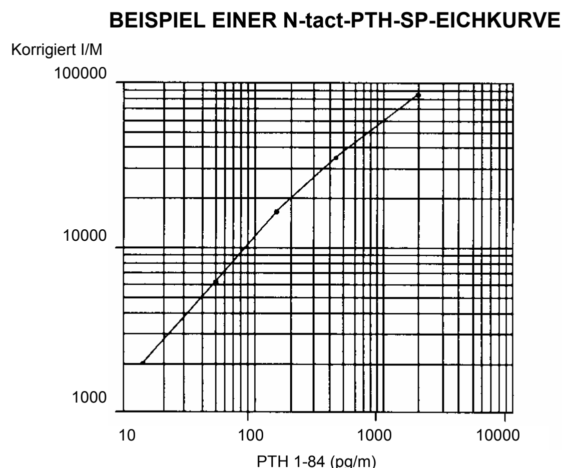


ABBILDUNG 1

13. GRENZEN DES VERFAHRENS

13.1 Wenn die ursprüngliche Konzentration einer unbekannten Probe größer ist als der größte Kalibratorwert, ist diese Probe nur mit 0-Kalibrator zu verdünnen.

13.2 Die Messzeiten sollten lange genug sein, um statistische Fehler zu reduzieren (z. B. ergibt eine Ansammlung von 2000 I/M eine Fehlerrate von 5 %; 10000 I/M ergeben 1 %).

DATENREDUKTION

Das Qualitätskontrolllabor von DiaSorin verwendet eine geglättete Spline-Kurvenanpassung.

14. ERWARTETE WERTE

NORMALBEREICH

Jedem Labor wird die Ermittlung eines eigenen Normalbereichs empfohlen. DiaSorin ermittelte einen Normalbereich aus dem Serum von 129 gesund erscheinenden, nüchternen Erwachsenen. Berechnungen ergaben ein geometrisches Mittel von 26 pg/ml, mit einem 2-S.A.-Bereich von 13-54 pg/ml.

KLINISCHE PROBEN

1. Serumproben von sechsundvierzig (46) Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus wurden mit dem N-tact-PTH-SP-Assay getestet. Die Werte für intaktes PTH lagen zwischen 43,6-686,1 pg/ml.
2. Vierzehn (14) Proben von Patienten mit Hypoparathyreoidismus wurden mit dem N-tact-PTH-SP-Assay getestet. Die Werte für intaktes PTH lagen zwischen 0-20,6 pg/ml.
3. Achtundvierzig (48) Patienten mit chronischer Nierenerkrankung wurden mit dem N-tact-PTH-SP-Assay getestet. Die Werte für intaktes PTH lagen zwischen 10,3-1042 pg/ml.
4. Vier (4) Proben von Patienten mit familiärem Hyperparathyreoidismus wurden mit dem N-tact-PTH-SP-Assay getestet. Die Werte für intaktes PTH lagen zwischen 59,5-100,5 pg/ml.

15. TESTCHARAKTERISTIKA

15.1 Präzision

Intra-Testvarianz (Werte in pg/ml). Zur Bestimmung der Intra-Testvarianz wurden 3 Serumkontrollen in 20facher Replikation in einem einzigen Assay getestet.

Probennummer	Mittelwert	S.A.	% V.K.
1	26	0.9	3.6
2	276	5.4	2.0
3	1,125	27.5	2.4

Inter-Testvarianz (Werte in pg/ml). Zur Bestimmung der Inter-Testvarianz wurden 3 Serumkontrollen von 4 Labortechnikern in 20 separaten Assays getestet.

Probennummer	Mittelwert	S.A.	% V.K.
1	49	1.6	3.4
2	285	13.1	4.6
3	1,111	54.8	4.9

15.2 Richtigkeit: Die Richtigkeit des Assays wurde mit Hilfe des Verdünnungs- und Wiederfindungstests überprüft.

Linearität

Serienverdünnungen von drei unbekannten Proben (Werte in pg/ml). (Proben mit 0 - Kalibrator verdünnt.)

Probennummer	Verdünnung	Gemessen	Berichtigt nach Verdünnung	% Erwartet
1	Unverdünnt	164	-------	100%
	1:2	77	154	94%
	1:4	36	144	87%
	1:8	19	152	93%
2	Unverdünnt	286	-------	100%
	1:2	139	278	97%
	1:4	72	288	100%
	1:8	36	288	101%
3	Unverdünnt	750	-------	100%
	1:2	357	714	95%
	1:4	184	736	98%
	1:8	100	800	106%

GENAUIGKEIT

Wiederfindungsuntersuchung (Werte in pg/ml)

Hintergrund-wert	Hinzugefügter Kalibrator	Erwarteter Wert	Gemessener Wert	Prozent Wiederfindung
Satz Nr. 1				
24.3	50	74.3	77.9	107
24.3	150	174.3	186.3	108
24.3	450	474.3	464	98
Satz Nr. 2				
17.7	50	67.7	69.5	104
17.7	150	167.7	177.6	107
17.7	450	467.7	471.7	101
Satz Nr. 3				
19.5	50	69.5	72.4	106
19.5	150	169.5	179.4	107
19.5	450	469.5	461.2	98
Satz Nr. 4				
10.6	50	60.6	60.4	100
10.6	150	160.6	163.9	102
10.6	450	460.6	435.8	94

15.3 Analytische Sensitivität

Wenn die geringste nachweisbare Konzentration als die anscheinende Konzentration bei 2 Standardabweichungen von den Zählungen bei minimaler Bindung definiert wird, beträgt sie 0,7 pg/ml.

15.4 Analytische Spezifität

Die Kreuzreaktivität des N-tact-PTH-SP-Systems wurde mit folgenden Human-PTH-Fragmenten bei 200000 pg/ml ermittelt.

Fragment	% Kreuzreaktivität
hPTH 39-84	<0,1
hPTH 53-84	<0,1
hPTH 39-68	<0,1
hPTH 44-68	<0,1
hPTH 1-34	<0,1
hPTH 13-34	<0,1
hPTH 1-84	100,0

LITERATURANGABEN FINDEN SIE AUF DER LETZTEN SEITE

TESTSCHEMA

1. Lyophilisierte Reagenzien rekonstituieren und gefrorene Proben vollständig auftauen lassen. Reagenzien und aufgetaute Proben während der Testvorbereitungen auf Eis belassen.
2. Röhrchen in doppelter Anordnung aufstellen.
3. Reagenzien wie folgt dispensieren:

Röhrchen/Reagenzien	Totalaktivität	Kal 0-5	Kontrollen und unbekannte Proben
Kalibratoren	-	200 µl	-
Kontrollen	-	-	200 µl
Unbekannte Proben	-	-	200 µl
Tracer	100 µl	100 µl	100 µl

4. Gut mischen.
5. In alle Röhrchen ein Kügelchen geben.
6. Röhrchen mit Parafilm abdecken, bei 20 – 25°C 22 Stunden (+/- 2 Stunden) inkubieren.
7. Reaktionsmischung aus jedem Röhrchen absaugen.
8. Kügelchen waschen. Dazu 1 ml Waschlösung mit so viel Kraft in jedes Röhrchen einfüllen, dass das Kügelchen vom Boden des Teströhrchens hochgehoben wird. Waschlösung absaugen. Diesen Waschvorgang dreimal durchführen.
9. Jedes Röhrchen in einem Gammamesser zählen.

N-TACT® ENSAYO INMUNORRADIOMÉTRICO DE HORMONA PARATIROIDEA

1. USO INDICADO

PARA UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICOS IN VITRO

Este equipo contiene instrucciones y materiales para la determinación cuantitativa de hormona paratiroidea humana biológicamente activa e intacta (hPTH 1-84) en suero o plasma mediante ensayo inmunorradiométrico (IRMA).

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El mantenimiento de los niveles adecuados de calcio en las células y fluidos extracelulares es de importancia fundamental para numerosos procesos biológicos y la hormona paratiroidea (PTH) es uno de los reguladores más importantes de la homeostasis del calcio.

Desde el punto de vista clínico, la medición de PTH se utiliza junto con determinaciones de calcio para evaluar trastornos del metabolismo del calcio.[1-3] La medición de PTH presenta dificultades debido a la heterogeneidad de los péptidos que se producen tanto en la glándula como en la circulación.[4]

La PTH se sintetiza en las glándulas paratiroideas como un precursor de aminoácido 115 denominado hormona preproparatiroidea. La hormona preproparatiroidea se convierte en una forma intermedia de aminoácido 90, la hormona proparatiroidea.[5] La acción proteolítica adicional convierte a la hormona intermedia en PTH 1-84 biológicamente activa.[6] Además de la formación de fragmentos dentro de la glándula, hay una descomposición proteolítica adicional de la PTH una vez que se libera a la circulación.[7, 8]

Hay estudios científicos que indican que sólo la PTH intacta y los fragmentos de PTH que contienen la secuencia de aminoácido 1-34 presentan actividad biológica. Concentraciones no significativas de los fragmentos N-terminales contribuyen al total circulante de hormona paratiroidea inmunorreactiva. Por consiguiente, cuando se utilizan los niveles de PTH para evaluar pacientes, la medición de PTH intacta se correlaciona mejor con su estado de metabolismo del calcio.[9-13]

La hormona paratiroidea y sus fragmentos se eliminan de la circulación por medio de los riñones y el hígado.[14] La eliminación de los fragmentos C-terminales es más lenta que la de la hormona intacta y depende en mayor grado de mecanismos renales.[15] En pacientes con insuficiencia renal grave o terminal, los fragmentos C-terminales se acumulan en niveles muy altos. Cuando se utiliza un ensayo de PTH específico para C-terminales, pueden encontrarse concentraciones elevadas de PTH simplemente debido a una menor eliminación de estos fragmentos biológicamente inactivos, lo cual complica la diferenciación de la hipocalcemia.[8,16-18]

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

El ensayo inmunorradiométrico DiaSorin de PTH SP (IRMA) utiliza 2 anticuerpos policlonales diferentes que se han purificado usando cromatografía de afinidad. Estos anticuerpos purificados son específicos para 2 regiones distintas de la molécula de PTH.

El primero, específico para PTH 39-84, se une con una fase sólida (glóbulos de poliestireno). El segundo es específico para PTH 1-34 y se etiqueta con yodo-125. Las muestras se incuban simultáneamente con ambos anticuerpos. La PTH 1-84 intacta contiene ambas secuencias de aminoácido 1-34 y 39-84 y es la única forma de PTH que tendrá unión tanto con el anticuerpo en el glóbulo como con el anticuerpo etiquetado con yodo-125.

Dado que el anticuerpo unido a la fase sólida es específico para los fragmentos de región C-terminal y media así como también PTH intacta, la capacidad de la fase sólida ha sido diseñada para permitir niveles de PTH muy altos. Esto impide que fragmentos de PTH de región C-terminal y media extremadamente elevados interfieran en muestras desconocidas.

Después del período de incubación, se lava cada glóbulo para retirar cualquier anticuerpo etiquetado no unido que hubiera. Luego, se mide la radiactividad presente en el anticuerpo etiquetado unido restante usando un contador gamma.

Las concentraciones de PTH intacta presentes en las muestras son directamente proporcionales a la radiactividad medida.

4. REACTIVOS SUMINISTRADOS CON EL EQUIPO

Calibrador 0 N-Tact PTH SP	1 vial/15 mL
Calibradores 1-5 N-Tact PTH SP	5 viales/2,0 mL
Glóbulos N-Tact PTH SP	1 contenedor/100 glóbulos
Anticuerpo ^{125}I N-Tact PTH SP	2 viales/5 mL
Concentrado de solución de lavado N-Tact PTH	1 vial/50 mL
Controles N-Tact PTH SP	2 viales/2,0 mL
Número de pruebas	100

ALMACENAMIENTO: Tras su recepción, el equipo debe almacenarse a 2-8 °C. Una vez abiertos, almacene los reactivos a 2-8 °C hasta la fecha de vencimiento que figura en la etiqueta. Los reactivos no deben utilizarse después de la fecha de vencimiento. La fecha de vencimiento del equipo se indica en la etiqueta externa y se corresponde con la fecha de vencimiento del trazador.

Cuando reconstituya el contenido de los viales, mezcle suavemente para evitar la formación de espuma. Almacene todos los reactivos reconstituidos a -15 °C o menos inmediatamente después de usarlos. No deben mezclarse reactivos de diferentes lotes.

4.1 Calibrador 0 N-tact PTH SP: reactivo listo para su uso
Contiene suero humano con un agregado de azida sódica al 0,1% como conservante.

4.2 Calibradores 1-5 N-tact PTH SP: reactivo liofilizado
Conjunto de 5 calibradores de PTH 1-84 humana a concentraciones nominales entre 15-2000 pg/mL, contiene azida sódica al 0,1% y otros estabilizadores. Los valores de concentración exactos se asignan con cada lote. Reconstituya cada vial de calibrador liofilizado con 2,0 mL del calibrador 0 que se suministra, mezcle revolviendo y deje reposar 5 minutos a 2-8 °C o hasta que el contenido se disuelva por completo. Los calibradores del equipo se calibran utilizando PTH humana sintética. Los calibradores del equipo han demostrado tener conmutabilidad con muestras de pacientes cuando se utilizan con los reactivos y el procedimiento recomendados para esta prueba de diagnóstico in vitro.

4.3 Glóbulos N-tact PTH SP: reactivo listo para su uso
Los glóbulos de poliestireno están revestidos con anticuerpo de cabra purificado por afinidad específico para la secuencia 39-84 de PTH.

4.4 Anticuerpo ^{125}I N-tact PTH SP: reactivo listo para su uso
Cada vial contiene 5,0 mL de anticuerpo de cabra purificado por afinidad específico para PTH 1-34, etiquetado con yodo-125. El anticuerpo etiquetado se diluye en suero con tampón que contiene colorante rojo y azida sódica al 0,1%.

4.5 Concentrado de solución de lavado N-tact PTH SP: reactivo en solución
Contiene un surfactante concentrado con tampón. Prepare una solución de lavado activa diluyendo la totalidad del contenido del vial con 450 mL de agua destilada o deionizada. Almacene la solución de lavado activa a temperatura ambiente.

4.6 Control N-tact PTH SP, nivel 1 y nivel 2: reactivo liofilizado

El suero humano se adiciona con hPTH 1-84 para obtener una concentración dentro de un rango específico. Se agrega azida sódica al 0,1%. Reconstituya cada control liofilizado con 2,0 mL de agua destilada o deionizada, mezcle y deje reposar a 2-8 °C hasta que el contenido se disuelva por completo. Los rangos de cada lote están impresos en los viales de control.

5. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

PARA UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICOS IN VITRO

No debe destinarse al uso interno o externo en seres humanos ni animales.

REACTIVOS QUE CONTIENEN MATERIAL DE ORIGEN HUMANO

Trátese como potencialmente infeccioso.

Todas las unidades de donantes de suero/plasma se han probado en conformidad con un método aprobado por la FDA y se han determinado como no reactivas para la presencia de HBsAg, anticuerpo para VHC y anticuerpo para VIH 1/2. Aunque estos métodos son altamente precisos, no garantizan que se detecten todas las unidades infectadas. Este producto también puede contener otros materiales de origen humano para los cuales no existe prueba homologada. Dado que ningún método de prueba puede ofrecer una seguridad total de la ausencia del virus de la hepatitis B (VHB), de la hepatitis C (VHC), el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) u otros agentes infecciosos, todos los productos que contengan material de origen humano se deben manejar de acuerdo con las prácticas de laboratorio correctas utilizando las precauciones adecuadas que se describen en el manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4ª edición, mayo de 1999 o actual, para centros de control y prevención de enfermedades/institutos nacionales de salud.

REACTIVOS CON CONTENIDO DE AZIDA SÓDICA

PRECAUCIÓN: Algunos reactivos de este equipo contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre y formar azidas metálicas altamente explosivas. Al desecharlo, enjuague con abundante agua para evitar que se acumule la azida. Para obtener información adicional, consulte “Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts,” en el manual Guide-Safety Management Nº CDC-22 publicado por Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 1976.

Advertencias establecidas en la Comunidad Europea sobre el riesgo de sustancias peligrosas (Directiva del Consejo 1999/45/EC)

R 20/21/22 - Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.

R 32 - En contacto con ácidos libera gases altamente tóxicos.

S28 - En caso de contacto con la piel, lávese inmediatamente con abundante agua.

REACTIVOS CON CONTENIDO DE YODO-125

Este equipo contiene material radiactivo que no supera 20 µCi (740 kBq) de yodo-125. Para almacenar, manejar y desechar este material, deben adoptarse las precauciones necesarias y prácticas de laboratorio correctas.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia genérica:

Este material radiactivo sólo deben recibirlo, adquirirlo, poseerlo y utilizarlo médicos, veterinarios que practiquen la medicina veterinaria, laboratorios clínicos u hospitales, y sólo para pruebas in vitro clínicas o de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa del material ni su radiación a seres humanos ni animales. Su recepción, adquisición, posesión, uso y transferencia se rigen por la normativa y la licencia genérica de la Comisión Reguladora Nuclear del estado en el que la Comisión haya llegado a un acuerdo para el ejercicio de su autoridad reguladora.

1. El almacenamiento del material radiactivo debe limitarse a un área destinada específicamente a tal efecto.
2. El acceso a materiales radiactivos debe estar limitado a personal autorizado únicamente.
3. No recoja material radiactivo con la pipeta usando la boca.
4. No coma ni beba dentro de las áreas destinadas a trabajos radiactivos.
5. Las áreas donde puedan producirse derrames deben enjugarse y después lavarse con un detergente alcalino o una solución decontaminante radiológica. Todo recipiente de vidrio utilizado debe enjuagarse completamente con agua antes de lavarse con otros recipientes de laboratorios.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia específica:
La recepción, uso, transferencia y eliminación de los materiales radiactivos se rigen por la normativa y las condiciones de la licencia en cuestión.

ADVERTENCIA: Este producto contiene una sustancia química conocida por el Estado de California como causante de cáncer.

ATENCIÓN: La radiactividad impresa en el interior del paquete puede diferir ligeramente de la impresa en la etiqueta de la caja y en la del vial del trazador. La etiqueta de la caja y la del trazador indican la cantidad real de radiactividad en la fecha de la calibración, mientras que el impreso del interior del paquete indica la radiactividad teórica del equipo.

6. INDICACIONES DE POSIBLE DETERIORO DE LOS REACTIVOS DEL EQUIPO

6.1 Desviación en la pendiente o posición de la curva del calibrador con respecto al resultado habitual.

6.2 Disminución de la unión máxima.

6.3 Unión cero no específica alta.

6.4 Valores duplicados deficientes.

7. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se requieren doscientos microlitros de suero o plasma EDTA, en duplicado, para su uso en el ensayo N-tact PTH SP.

Con este equipo puede utilizarse suero o plasma humanos. En este ensayo pueden utilizarse los anticoagulantes EDTA. Es recomendable tomar la muestra en ayunas, pero no es imprescindible. La sangre debe recolectarse asépticamente por punción venosa en un tubo de vidrio vacío de 5 ó 10 mL. Deje que la sangre coagule a temperatura ambiente (15-25 °C). Centrifugue durante 15 minutos con aproximadamente 760 x g* para obtener suero no hemolizado. Para mantener la integridad de la muestra no se requieren aditivos ni conservantes. Todos los materiales de plástico, vidrio u otros que entren en contacto con la muestra deben estar completamente limpios de contaminación. Almacene las muestras de suero o plasma a -20 °C o menos. Las muestras pueden almacenarse en viales de vidrio o plástico, siempre que estén herméticamente cerrados para prevenir la desecación del contenido.

Los laboratorios compararon las muestras de plasma y suero EDTA normales. No se detectaron diferencias significativas en los valores.

*g = (1118×10^{-8}) (radio en cm) $(\text{rpm})^2$

8. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

8.1 Reconstituya los reactivos liofilizados y permita que se descongelen por completo los especímenes congelados que hubiera. Mantenga a los reactivos y especímenes descongelados en hielo mientras organiza el ensayo.

8.2 Organice tubos de vidrio de borosilicato de 12 x 75 mm etiquetados en duplicado de acuerdo con el Programa del ensayo.

8.3 Agregue reactivos a los tubos como sigue:

a. Tubos de cuentas totales
100 µL de anticuerpo ^{125}I N-tact PTH SP (rojo)

b. Calibrador 0
200 µL de calibrador 0
100 µL de anticuerpo ^{125}I N-tact PTH SP (rojo)

c. Calibradores (1-5)
200 µL de calibrador
100 µL de anticuerpo ^{125}I N-tact PTH SP (rojo)

d. Controles y muestras desconocidas
200 µL de muestra
100 µL de anticuerpo ^{125}I N-tact PTH SP (rojo)

8.4 Agite en vórtex todos los tubos.

8.5 Distribuya un glóbulo en cada tubo utilizando fórceps revestidos con teflón o un distribuidor adecuado para el manejo de glóbulos. (No use los dedos.)

8.6 Cubra los tubos con parafilm o un equivalente.

8.7 Incube los tubos durante 22 (±2) horas a 20-25 °C.

8.8 Aspire la mezcla de reacción de cada tubo.

8.9 Lave los glóbulos enérgicamente distribuyendo 1 mL de solución de lavado dentro de cada tubo con fuerza suficiente como para elevar el glóbulo desde el fondo del tubo de prueba. Aspire la solución de lavado. Repita el procedimiento de lavado 3 veces.

8.10 Mida la radiactividad presente en cada tubo utilizando un contador gamma.

9. EQUIPO Y MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

9.1 Tubos desechables de vidrio de borosilicato, 12 x 75 mm.

9.2 Portatubos de prueba.

9.3 Contador gamma válido para yodo 125.

9.4 Mezclador vórtex.

9.5 Utensilios de dosificación:

a. Micropipetador calibrado para distribuir 200 µL.

b. Distribuidores repetidores, calibrados para distribuir 100 µL y 1 mL.

c. Pipetas volumétricas para reconstituir controles y calibradores.

9.6 Parafilm o un equivalente para cubrir los tubos de ensayo.

9.7 Fórceps revestidos con teflón u otro dispositivo aprobado del equipo para distribuir glóbulos.

9.8 Unidad de aspiración para aspirar el anticuerpo ^{125}I y las soluciones de lavado.

*g = (1118×10^{-8}) (radio en cm) $(rpm)^2$

10. COMENTARIOS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

10.1 Cuando agregue glóbulos a los tubos, incline el portatubos levemente para que los glóbulos rueden dentro de los tubos. Esto evitará que haya demasiadas salpicaduras de la solución de prueba. No maneje los glóbulos con los dedos.

10.2 Pipetee anticuerpo ^{125}I hasta llenar el tercio inferior del tubo de prueba.

10.3 Para que un laboratorio pueda monitorear el desempeño uniforme de un ensayo RIA hay factores adicionales que deben comprobarse. DiaSorin sugiere realizar una comprobación de los siguientes parámetros en cada ensayo para asegurar el desempeño uniforme del equipo.

a. Cuentas totales

b. Unión máxima
Cuentas por minuto (CPM) del tubo de calibrador 2000

c. Unión no específica
CPM del tubo de calibrador 0

11. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe incluir ambos sueros de control del equipo en cada ensayo para asegurar la validez de los resultados de cada ensayo. Luego, debe determinarse una desviación media y estándar para cada control usando un mínimo de diez (10) ensayos. Entonces se puede obtener un rango aceptable de valores para estos controles usando desviaciones estándar de ±2 de los valores previamente determinados. El laboratorio de control de calidad de DiaSorin ha determinado un rango para los controles que se incluyen en este equipo.

12. CÁLCULO DE RESULTADOS

Para determinar la concentración de PTH intacta que se encuentra en muestras desconocidas y de control, se prepara una curva de calibrador utilizando las concentraciones del calibrador indicadas en las etiquetas de los viales. Los valores se generan como sigue:

12.1 Calcule el promedio de CMP de cada calibrador, control y muestra desconocida.

12.2 Reste el promedio de CPM de los tubos de calibrador 0 a todas las demás cuentas promedio para obtener las CPM corregidas.

12.3 Usando papel gráfico log-log, trace la CPM corregida de cada nivel de calibrador en la ordenada contra la concentración del calibrador en la abscisa.

12.4 Interpole los niveles de PTH en las muestras a partir del trazado.

12.5 Si la lectura de cualquiera de las muestras desconocidas es mayor que el calibrador más alto, se la debe diluir correctamente con calibrador 0 y volver a realizarle el ensayo.

12.6 Si alguna muestra desconocida está diluida, corríjala para obtener el factor de dilución adecuado.

12.7 Los valores inferiores al calibrador 1 pero mayores que 0,7 pg/mL (sensibilidad del ensayo) pueden calcularse utilizando la fórmula:

$$\text{Valores de desconocidas} = \frac{\text{CPM corregida (desconocida)}}{\text{CPM corregida (cal. 1)}} \text{ x valor de cal. 1}$$

TABLA I
Datos de muestras de N-tact PTH SP

Tubo	Duplicada CPM	Promedio CPM	Corregida CPM	Conc. (pg/mL)	B/T
Cuenta total	260.242	256.889			
	253,536				
Calibrador 0	384	379			
	374				
Calibradores (pg/mL)					
1 (15)	2.324	2338	1959		
	2.351				
2 (50)	6.469	6550	6171		
	6.630				
3 (150)	16.390	16.340	15.961		
	16.289				
4 (450)	34.605	34.926	34.547		
	35.246				
5 (2,000)	85.678	84.864	84.485		33%
84.050					
Muestras desconocidas					
1	6.494	6472	6093	49	
	6.450				
2	34.144	34.538	34.159	442	
	34.932				

Los datos típicos de muestras y una curva de calibrador para PTH SP intacta se indican en la TABLA I y la FIGURA 1; ésta es sólo información de referencia y no debe usarse para el cálculo de ningún valor.

CURVA DE CALIBRADOR DE LA MUESTRA DE N-tact PTH SP

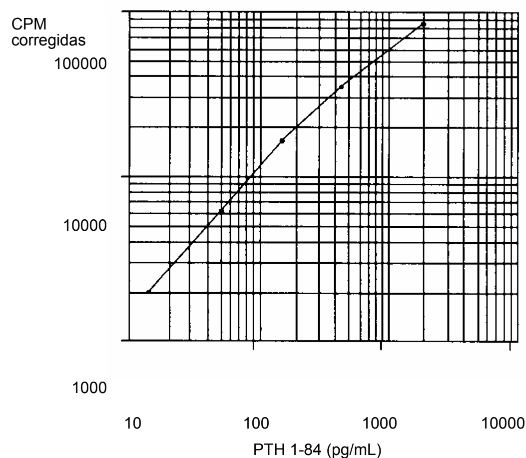


FIGURA 1

13. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

13.1 Si la concentración inicial de una muestra desconocida es mayor que el calibrador más alto, diluya sólo con calibrador 0.

13.2 Se debe contar un número de veces suficiente para reducir el error estadístico (por ejemplo, la acumulación de 2000 CPM proporcionará el 5% de error; 10.000 CPM proporcionará el 1% de error).

DATOS DE REDUCCIÓN

El laboratorio de control de calidad de DiaSorin utiliza un ajuste de línea estriada alisada.

14. VALORES PREVISTOS

RANGO NORMAL

Cada laboratorio debe establecer su propio rango normal. DiaSorin ha establecido un rango normal usando suero de 129 adultos aparentemente sanos en ayunas. La media geométrica se calculó en 26 pg/mL con un rango de 2 S.D. de 13-54 pg/mL.

ESPECÍMENES CLÍNICOS

1. Se analizaron muestras de suero de cuarenta y seis (46) pacientes con hiperparatiroidismo primario en el sistema de ensayo N-tact PTH SP. Los valores de PTH intacta variaron entre 43,6-686,1 pg/mL.
2. Se analizaron catorce (14) muestras de pacientes con diagnóstico de hipoparatiroidismo en el sistema de ensayo N-tact PTH SP. Los valores para PTH intacta variaron entre 0-20,6 pg/mL.
3. Se analizaron cuarenta y ocho (48) pacientes con enfermedad renal crónica en el sistema de ensayo N-tact PTH SP. Los valores de PTH intacta variaron entre 10,3-1042 pg/mL.
4. Se analizaron cuatro (4) muestras correspondientes a pacientes con hiperparatiroidismo familiar en el sistema de ensayo N-tact PTH SP. Los valores de PTH intacta variaron entre 59,5-100,5 pg/mL.

15. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO ESPECÍFICAS

15.1 Precisión

Variación intra ensayo (valores = pg/mL). Se realizaron tres controles de suero en réplicas de 20 en un único ensayo para determinar la variación dentro del ensayo.

Número de la muestra	Valor de la media	S.D.	(% C.V.)
1	26	0.9	3.6
2	276	5.4	2.0
3	1,125	27.5	2.4

Variación entre ensayos (valores = pg/mL). 4 técnicos realizaron tres controles de suero en 20 ensayos separados para determinar la variación entre ensayos.

Número de la muestra	Valor de la media	S.D.	(% C.V.)
1	49	1.6	3.4
2	285	13.1	4.6
3	1,111	54.8	4.9

15.2 Veracidad: La veracidad del ensayo se ha comprobado mediante la prueba de dilución y la de recuperación.

Paralelismo

Estudio de dilución serial de 3 muestras desconocidas (valores = pg/mL). (Muestras diluidas con calibrador 0 .)

Número de la muestra	Dilución	Conc.	Corregida para dilución	% obtenido
1	No diluida	164	-------	100%
	1:2	77	154	94%
	1:4	36	144	87%
	1:8	19	152	93%
2	No diluida	286	-------	100%
	1:2	139	278	97%
	1:4	72	288	100%
	1:8	36	288	101%
3	No diluida	750	-------	100%
	1:2	357	714	95%
	1:4	184	736	98%
	1:8	100	800	106%

EXACTITUD

Estudio de recuperación (valores = pg/mL)

Valor de segundo plano	Calibrador agregado	Valor previsto	Valor medido	Porcentaje de recuperación
Conjunto Nº 1				
24.3	50	74.3	77.9	107
24.3	150	174.3	186.3	108
24.3	450	474.3	464	98
Conjunto Nº 2				
17.7	50	67.7	69.5	104
17.7	150	167.7	177.6	107
17.7	450	467.7	471.7	101
Conjunto Nº 3				
19.5	50	69.5	72.4	106
19.5	150	169.5	179.4	107
19.5	450	469.5	461.2	98
Conjunto Nº 4				
10.6	50	60.6	60.4	100
10.6	150	160.6	163.9	102
10.6	450	460.6	435.8	94

15.3 Sensibilidad analítica

Cuando se la define como la concentración evidente en 2 desviaciones estándar de las cuentas con una unión mínima, la cantidad detectable mínima es 0,7 pg/mL.

15.4 Especificidad analítica

La reactividad cruzada del sistema N-tact PTH SP se realizó con los siguientes fragmentos de PTH humana en 200.000 pg/mL.

% de reactividad cruzada	del fragmento
hPTH 39-84	<0,1
hPTH 53-84	<0,1
hPTH 39-68	<0,1
hPTH 44-68	<0,1
hPTH 1-34	<0,1
hPTH 13-34	<0,1
hPTH 1-84	100,0

CONSULTE LA BIBLIOGRAFÍA EN LA ÚLTIMA PÁGINA

PROGRAMA DEL ENSAYO

1. Reconstituya los reactivos liofilizados y permita que se descongelen por completo los especímenes congelados que hubiera. Mantenga a los reactivos y especímenes descongelados en hielo mientras organiza el ensayo.

2. Identifique los tubos por duplicado.

3. Suministre los reactivos según el siguiente programa:

Tubos/Reactivos	Cuentas totales	Cal 0-5	Muestras de control y desconocidas
Calibradores	-	200 µL	-
Controles	-	-	200 µL
Muestras desconocidas	-	-	200 µL
Trazador	100 µL	100 µL	100 µL

4. Mezcle bien.

5. Distribuya un glóbulo en todos los tubos.

6. Cubra los tubos con parafilm, incube durante 22 horas (+/- 2 horas) a 20 - 25 °C.

7. Aspire la mezcla de reacción de cada tubo.

8. Lave los glóbulos enérgicamente distribuyendo 1 mL de solución de lavado dentro de cada tubo con fuerza suficiente como para elevar el glóbulo desde el fondo del tubo de prueba. Aspire la solución de lavado. Repita el procedimiento de lavado 3 veces.

9. Cuente cada tubo en un contador gamma.

ANALISI IMMUNORADIOMETRICA N-TACT® PER L'ORMONE PARATIROIDEO

1. USO PREVISTO

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.
Questo kit contiene istruzioni e materiali per la determinazione quantitativa dell'ormone paratiroideo intatto biologicamente attivo (hPTH 1-84, Human ParaThyroid Hormone) nel siero o plasma umano mediante analisi immunoradiometrica (IRMA).

2. SOMMARIO E SPIEGAZIONI

Il mantenimento di giusti livelli di calcio nelle cellule e nei fluidi extracellulari è di fondamentale importanza per molti processi biologici, e l'ormone paratiroideo (PTH) rappresenta uno dei più importanti regolatori di omeostasi del calcio.

Dal punto di vista clinico, la misurazione di PTH viene considerata unitamente alle determinazioni di calcio al fine di valutare alterazioni nel metabolismo del calcio.[1-3] La misurazione di PTH si è rivelata essere difficile a causa dell'eterogeneità dei peptidi nella ghiandola e nella circolazione.[4]

Il PTH viene sintetizzato nelle ghiandole paratiroidee come un precursore dell'amminoacido 115 noto come ormone preproparatiroideo. L'ormone preproparatiroideo viene convertito in una forma intermedia dell'amminoacido 90, l'ormone proparatiroideo.[5] Una successiva azione proteolitica converte l'ormone intermedio in PTH 1-84 biologicamente attivo.[6] In aggiunta alla formazione di frammenti all'interno della ghiandola, si verifica una ulteriore scissione proteolitica di PTH una volta che questo viene rilasciato in circolo.[7, 8]

Studi scientifici indicano solo che PTH intatto e frammenti di PTH contenenti la sequenza di amminoacido 1-34 presentano attività biologica. Concentrazioni irrilevanti di frammenti N-terminale favoriscono la circolazione dell'ormone paratiroideo immunoreattivo. Pertanto, quando si valutano livelli PTH, la misurazione di PTH intatto è meglio rapportata con il rispettivo stato del metabolismo del calcio.[9-13]

L'ormone paratiroideo e relativi frammenti vengono eliminati dai reni e dal fegato.[14] La clearance di frammenti C-terminali è più lenta rispetto alla clearance dell'ormone intatto ed è maggiormente soggetta dalle funzioni renali.[15] In pazienti con insufficienza renale severa o allo stadio finale, i frammenti C-terminale si accumulano in livelli molto elevati. Quando si adotta un'analisi PTH specifica per C-terminale, è possibile che concentrazioni elevate di PTH vengano rilevate semplicemente per una diminuita clearance di tali frammenti biologicamente inattivi, che complicano la differenziazione di ipercalcemia.[8,16-18]

3. PRINCIPIO DELL'ANALISI

L'analisi immunoradiometrica (IRMA) DiaSorin per PTH SP intatto utilizza 2 diversi anticorpi policlonali che sono stati purificati mediante cromatografia di affinità. Tali anticorpi purificati sono specifici per 2 regioni diverse della molecola PTH.

Il primo anticorpo, specifico per PTH 39-84, è legato a una fase solida (granuli di polistirene). Il secondo anticorpo è specifico per PTH 1-34 ed è etichettato con iodio-125. I campioni vengono incubati contemporaneamente con entrambi gli anticorpi. Il PTH 1-84 intatto contiene entrambe le sequenze di amminoacidi 1-34 e 39-84 ed è l'unica forma di PTH che si legherà all'anticorpo sul granulo e all'anticorpo etichettato con iodio-125.

Poiché l'anticorpo accoppiato alla fase solida è specifico per i frammenti C-terminale e la regione intermedia, nonché per PTH intatto, la capacità della fase solida è stata ideata per conformarsi a livelli molto elevati di PTH. Ciò evita l'interferenza da parte di frammenti PTH della regione media e C-terminale estremamente elevati in campioni non noti.

Al termine del periodo di incubazione, ogni granulo viene lavato per rimuovere eventuali anticorpi liberi. La radioattività presente nel restante anticorpo legato viene quindi misurata mediante un contatore a raggi gamma.

Le concentrazioni di PTH intatto presenti nei campioni sono direttamente proporzionali alla radioattività misurata.

4. REAGENTI FORNITI CON IL KIT

Calibratore 0 N-Tact PTH SP	1 fiala/15 mL
Calibratori 1-5 N-Tact PTH SP	5 fiale/2,0 mL
Granuli N-Tact PTH SP	1 contenitore/100 granuli
^{125} Anticorpo I N-Tact PTH SP	2 fiale/5 mL
Conc. per la soluzione di lavaggio N-Tact PTH SP	1 fiala/ 50 mL
Controlli N-Tact PTH SP	2 fiale/ 2,0 mL
Numero di test	100

CONSERVAZIONE: Il kit deve essere conservato a 2-8 °C. Dopo l'apertura, conservare ogni reagente a 2-8 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. I reagenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza. La data di scadenza del kit è indicata sull'etichetta esterna e si riferisce alla data di scadenza del tracciante.

Durante la ricostituzione del contenuto delle fiale, mescolare delicatamente al fine di evitare la formazione di schiuma. Conservare tutti i reagenti ricostituiti a -15 °C o a temperatura inferiore immediatamente dopo l'uso. Non si devono mescolare reagente di lotti diversi.

4.1 Calibratore 0 N-tact PTH SP: reagente pronto all'uso
Contiene siero umano con 0,1% sodio azide aggiunto come conservate.

4.2 Calibratori 1-5 N-tact PTH SP: reagente liofilizzato
Serie di 5 calibratori PTH 1-84 umano, a concentrazioni nominali variabili da 15 a 2000 pg/mL, contiene 0,1% sodio azide ed altri stabilizzatori. I valori esatti della concentrazione vengono indicati per ogni lotto. Ricostituire ogni fiala di calibratore liofilizzato con 2,0 mL del calibratore 0 fornito in dotazione, agitare energicamente e lasciare a riposo per 5 minuti a 2-8 °C o fino a quanto il contenuto è completamente sciolto. I calibratori di questo kit sono calibrati utilizzando PTH umano sintetico. I calibratori del kit dimostrano commutabilità con i campioni del paziente quando usati con reagenti e con la procedura operativa di questo test diagnostico in vitro, come consigliato.

4.3 Granuli N-tact PTH SP: reagente pronto all'uso
Granuli in polistirene rivestiti con anticorpo di capra purificato mediante affinità specifico per la sequenza 39-84 di PTH.

4.4 ^{125}Anticorpo I N-tact PTH SP: reagente pronto all'uso
Ogni fiale contiene 5,0 mL di anticorpo di capra purificato mediante affinità specifico per PTH 1-34, etichettato con iodio-125. L'anticorpo etichettato è diluito in siero tamponato contenente colorante rosso e 0,1% sodio azide.

4.5 Concentrato per la soluzione di lavaggio N-tact PTH SP: reagente in soluzione
Contiene un surfattante tamponato concentrato. Preparare una soluzione di lavaggio diluendo il contenuto dell'intera fiala con 450 mL di acqua distillata o deionizzata. Conservare la soluzione di lavaggio a temperatura ambiente.

4.6 Controllo N-tact PTH SP, Livello 1 e Livello 2: reagente liofilizzato
Nel siero umano si aggiunge hPTH 1-84 per ottenere una concentrazione nei range specificati. È presente 0,1% sodio azide. Ricostituire ogni controllo liofilizzato con 2,0 mL di acqua distillata o deionizzata, mescolare e lasciare riposare a 2-8 °C fino a quando il contenuto è completamente disciolto. I range per ogni lotto sono stampati sulle fiale dei controlli.

5. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.
Non per uso interno o esterno su animali o persone.

REAGENTI CONTENENTI MATERIALE DI PROVENIENZA UMANA

Trattare come potenzialmente infettivi.
Ogni unità di siero/plasma da donatore usata nella preparazione di questo prodotto è stata testata con una metodica approvata dalla FDA statunitense e trovata non reattiva per la presenza di HBsAg, anticorpi ad HCV ed anticorpi ad HIV 1/2. Anche se questi metodi sono estremamente accurati, non è garantita la localizzazione di tutte le unità infette. Questo prodotto può inoltre contenere altro materiale di provenienza umana per il quale non esiste un test approvato. Poiché nessuna metodologia di test approvata può offrire garanzia completa sull'assenza del virus dell'epatite B (HBV), dell'epatite C (HCV), del virus di immunodeficienza (HIV) o di altri agenti infettivi, tutto il materiale di provenienza umana deve essere trattato in conformità con le buone pratiche di laboratorio adottando le precauzioni appropriate come descritto nei manuale dei Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," quarta edizione, Maggio 1999 o edizione corrente.

REAGENTI CONTENENTI SODIO AZIDE

ATTENZIONE: Alcuni reagenti di questo kit contengono sodio azide. La sodio azide può reagire con componenti in piombo o rame e formare quindi azidi metalliche altamente esplosive. Al momento dello smaltimento, lavare con abbondante acqua al fine di evitare la formazione di azide. Per ulteriori informazioni, consultare "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" nel manuale Guide-Safety Management No. CDC-22 pubblicato dai Centri per il controllo e la Prevenzione delle malattie di Atlanta, GA,

Frasi di rischio per sostanze pericolose della Comunità Europea (Direttiva del Consiglio 1999/45/CE)
R 20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed (Dannoso per inalazione, per contatto con la pelle ed ingestione).
R 32 - Contact with acids liberates very toxic gas (Il contatto con acidi libera gas altamente tossico).
S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water (Dopo il contatto con la pelle, lavare immediatamente con abbondante acqua).

REAGENTI CONTENENTI IODIO-125

Questo kit contiene materiale radioattivo che non supera 20 µCi (740 kBq) di iodio-125. Adottare precauzioni adeguate e le buone pratiche di laboratorio per la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento di questo materiale.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza generale:

Questo materiale radioattivo può essere consegnato, acquisito, conservato e usato unicamente da personale medico, veterinari abilitati alla pratica di medicina veterinaria, laboratori clinici o ospedali e unicamente per test in vitro clinici o di laboratorio che non prevedano la somministrazione interna o esterna del materiale, o di radiazioni da esso derivanti, su persone o animali. L'acquisto, il possesso, la conservazione, l'uso e il trasferimento sono soggetti alle norme e alla licenza generale della Nuclear Regulatory Commission statunitense dello stato con cui la Commissione ha stipulato un accordo per l'esercizio dell'autorità normativa.

1. La conservazione del materiale radioattivo deve essere limitata ad un'area specificatamente designata.
2. L'accesso ai materiali radioattivi deve essere limitato esclusivamente al personale autorizzato.

3. Non usare la bocca per versare con la pipetta materiale radioattivo.
4. Non mangiare o bere nelle aree di lavoro designate per materiale radioattivo.
5. Le zone dove possono verificarsi perdite devono essere pulite, quindi lavate con detergente alcalino o soluzione per la decontaminazione radiologica. Tutti gli oggetti in vetro usati devono essere accuratamente risciacquati con acqua prima di lavarli con altri oggetti in vetro del laboratorio.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza specifica: L'acquisto, l'uso, il trasferimento e lo smaltimento di materiali radioattivi sono soggetti alle norme e alle condizioni della licenza specifica.

AVVERTENZA: Questo prodotto contiene un prodotto chimico noto nello Stato della California per provocare cancro.

ATTENZIONE: La radioattività stampata sulle istruzioni allegate alla confezione può essere leggermente diversa dalla radioattività stampata sull'etichetta della scatola e sull'etichetta della fiala di tracciante. L'etichetta sulla scatola e sulla fiala di tracciante indicano la quantità effettiva di radioattività alla data di calibrazione, mentre il materiale informativo della confezione indica la radioattività teorica del kit.

6. INDICAZIONI DI POSSIBILE DETERIORAMENTO DEI REAGENTI DEL KIT

6.1 Uno sfasamento nella pendenza o posizione della curva di calibrazione rispetto a quella che normalmente si ottiene.

6.2 Una diminuzione del legame massimo.

6.3 Un legame zero altamente non specifico.

6.4 Valori non soddisfacente dei duplicati.

7. RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE

Sono richiesti duecento (200) microlitri di siero o plasma EDTA, in due serie, da usare per l'analisi N-tact PTH SP.

Con questo kit si può usare siero o plasma umano. Per questa analisi si possono usare anticoagulanti EDTA. Si consigliano campioni prelevati a digiuno, anche se non obbligatorio. Il sangue deve essere prelevato in maniera asettica mediante venopuntura in una provetta di vetro da 5 o 10 mL sotto vuoto. Lasciar coagulare il sangue a temperatura ambiente (15-25 °C). Centrifugare per 15 minuti usando circa 760 x g* per ottenere sieri privi di emolisi. Non sono richiesti additivi o conservanti per mantenere l'integrità del campione. Tutto il materiale in plastica, oggetti in vetro o altro materiale che viene a contatto con i campioni deve essere completamente esente da qualsiasi contaminazione. Conservare i campioni di siero o plasma a -20 °C o a temperatura inferiore. I campioni possono essere conservati in fiale di plastica o vetro, purché le fiale siano sigillate ermeticamente al fine di evitare l'essiccazione del campione.

Il normale plasma EDTA e i campioni di siero sono stati messi a confronto dai laboratori DiaSorin. Non sono state notate differenze significative nei valori.

8. PROCEDURA DI ANALISI

8.1 Ricostituire i reagenti liofilizzati e lasciar scongelare completamente eventuali campioni congelati. Tenere i reagenti e i campioni congelati sul ghiaccio mentre si prepara l'analisi.

8.2 Preparare due serie di provette in vetro borosilicato 12 x 75 mm etichettate in base allo Schema di analisi.

8.3 Aggiungere i reagenti nelle provette come indicato di seguito:

a. Provette per il conteggio totale
100 µL di anticorpo ^{125}I N-tact PTH SP (rosso)

*g = (1118×10^{-8}) (raggio in cm) $(rpm)^2$

b. **Calibratore 0**
200 µL di calibratore 0
100 µL ^{125}di anticorpo I N-tact PTH SP (rosso)

c. **Calibratori (1-5)**
200 µL di calibratore
100 µL ^{125}di anticorpo I N-tact PTH SP (rosso)

d. **Controlli e campioni non noti**
200 µL di campione
100 µL ^{125}di anticorpo I N-tact PTH SP (rosso)

8.4 Agitare nel Vortex tutte le provette.

8.5 Distribuire un granulo in ogni provetta utilizzando un forcipe rivestito in teflon o un dosatore adatto per la manipolazione dei granuli (non usare le dita).

8.6 Coprire le provette con pellicola o equivalente.

8.7 Lasciare in incubazione le provette per 22 (±2) ore a 20-25 °C.

8.8 Aspirare da ogni provetta la miscela formatasi dalla reazione.

8.9 Lavare energicamente i granuli versando 1 mL di soluzione di lavaggio in ogni provetta con una forza sufficiente a sollevare i granuli dal fondo della provetta. Aspirare la soluzione di lavaggio. Ripetere tre volte la procedura di lavaggio.

8.9 Misurare la radioattività presente in ogni provetta utilizzando un contatore a raggi gamma.

9. ATTREZZATURE E MATERIALI NECESSARI, NON FORNITI IN DOTAZIONE

9.1 Provette in vetro borosilicato monouso, 12 x 75 mm.

9.2 Alloggiamento per le provette per i test.

9.3 Contatore a raggi gamma adatto per il conteggio di iodio-125.

9.4 Mixer Vortex.

9.5 Dispositivi per operazioni con pipetta

- **a.** Micropipette dosatrici calibrate per inviare 200 µL.
- **b.** Dosatori a ripetizione, calibrati per inviare 100 µL e 1 mL.
- **c.** Pipette volumetriche per la ricostituzione dei controlli e dei calibratori.

9.6 Pellicola o equivalente per coprire le provette.

9.7 Forcipe rivestito in teflon o altro accessorio approvato per questo kit per distribuire i granuli.

9.8 Unità di aspirazione per aspirare l'anticorpo ^{125}I e le soluzioni di lavaggio.

10. COMMENTI ALLA PROCEDURA

10.1 Quando si versano i granuli nelle provette, inclinare leggermente il portaprovette e far scivolare i granuli nelle provette. In questo modo si evita di far schizzare la soluzione di test. Non maneggiare i granuli con le dita.

10.2 Con la pipetta, aggiungere l'anticorpo ^{125}I al terzo inferiore della provetta di analisi.

10.3 Per monitorare completamente la costanza e la validità di un'analisi RIA, si devono controllare altri fattori. DiaSorin consiglia di eseguire un controllo per ogni analisi dei seguenti parametri per garantire prestazioni costanti del kit.

a. Conteggi totali

b. Legame massimo
Conteggi al minuto (CPM) della provetta del calibratore 2000

c. Legame non specifico
CPM della provetta del calibratore 0

*g = (1118×10^{-8}) (raggio in cm) $(rpm)^2$

11. CONTROLLO DI QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe includere entrambi i sieri di controllo di ogni analisi per garantire la validità dei risultati di ogni analisi. Determinare quindi la deviazione media e standard per ogni controllo usando un minimo di dieci (10) analisi. Si può quindi ottenere un range accettabile di valori per questi controlli utilizzando ±2 deviazioni standard dei valori determinati in precedenza. Il Laboratorio di Controllo della Qualità DiaSorin ha stabilito un range per i controlli inclusi nel kit.

12. CALCOLO DEI RISULTATI

Per stabilire la concentrazione del PTH intatto trovato in campioni di controllo e non noti, creare una curva utilizzando le concentrazioni del calibratore indicate sulle etichette delle fiale. I valori sono ottenuti come segue:

12.1 Calcolare il CPM medio per ogni calibratore, controllo e campione non noto.

12.2 Sottrarre il CPM medio delle provette del calibratore 0 da tutti gli altri conteggi medi per ottenere i CPM esatti.

12.3 Usando una carta millimetrata per modello log-log, tracciare l'esatto CPM del livello di ogni calibratore sull'asse delle ordinate e la concentrazione del calibratore sull'asse delle ascisse.

12.4 Interpolare i livelli di PTH nei campioni dal tracciato.

12.5 Se un campione non noto dà una lettura maggiore rispetto al calibratore superiore, il campione dovrà essere diluito correttamente con il calibratore 0 e analizzato nuovamente.

12.6 Se un campione non noto è stato diluito, correggere con il fattore di diluizione idoneo.

12.7 I valori inferiori al Calibratore 1 ma superiori a 0.7 pg/mL (sensibilità dell'analisi) possono essere calcolati usando la seguente formula:

$$\text{Valori non noti} = \frac{\text{CPM corretto (non noto)}}{\text{CPM corretto (Cal. 1)}} \text{ x Valore di Cal. 1}$$

TABELLA I
Dati campione N-tact PTH SP

Provetta	CPM duplicato	CPM medio	CPM corretto	Conc. (pg/mL)	B/T
Conteggio totale	260,242 253,536	256,889			
Calibratore 0	384 374	379			
Calibratori (pg/mL)					
1 (15)	2,324 2,351	2,338	1,959		
2 (50)	6,469 6,630	6,550	6,171		
3 (150)	16,390 16,289	16,340	15,961		
4 (450)	34,605 35,246	34,926	34,547		
5 (2,000) 84,050	85,678	84,864	84,485		33%
Campioni non noti					
1	6,494 6,450	6,472	6,093	49	
2	34,144 34,932	34,538	34,159	442	

I dati di campioni tipici e una curva di calibratore per PTH SP intatto sono riportati nella TABELLA I e nella FIGURA 1; queste informazioni servono solo a scopo di riferimento e non devono essere usate per il calcolo dei valori.

ESEMPIO DI CURVA DI CALIBRAZIONE N-tact PTH SP

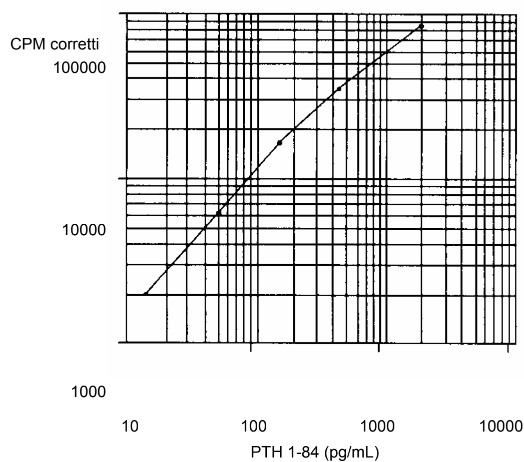


FIGURA 1

13. LIMITI DELLA PROCEDURA

13.1 Se la concentrazione iniziale di un campione non noto è maggiore del calibratore superiore, diluire solo con il Calibratore 0.

13.2 Il conteggio delle volte dovrebbe essere sufficiente per ridurre errori statistici (ad esempio, l'accumulo di 2.000 CPM produrrà un errore del 5%; 10.000 CPM produrrà un errore dell'1%).

RIDUZIONE DEI DATI

Il Laboratorio di controllo di qualità DiaSorin QC utilizza una retta curvilinea uniforme.

14. VALORI PREVISTI

Range normale

Ogni laboratorio deve stabilire un range di riferimento proprio. Un range normale è stato definito da DiaSorin utilizzando siero prelevato da 129 adulti apparentemente sani, a digiuno. La media geometrica è stata calcolata essere 26 pg/mL con un range 2 S.D. di 13-54 pg/mL.

CAMPIONI CLINICI

1. Campioni di siero prelevati da quarantasei (46) pazienti affetti da iperparatiroidismo primario sono stati analizzati con il sistema di analisi N-tact PTH SP. I valori di PTH intatto variavano fra 43,6-686,1 pg/mL.
2. Quattordici (14) campioni prelevati da pazienti diagnosticati essere affetti da ipoparatiroidismo sono stati analizzati con il sistema di analisi N-tact PTH SP. I valori del PTH intatto variavano fra 0-20,6 pg/mL.
3. Quarantotto (48) pazienti affetti da disturbi renali cronici sono stati analizzati con il sistema di analisi N-tact PTH SP. I valori di PTH variavano fra 10,3-1042 pg/mL.
4. Quattro (4) campioni di pazienti affetti da iperparatiroidismo familiare sono stati analizzati con il sistema di analisi N-tact PTH SP. I valori di PTH intatto variavano fra 59,5-100,5 pg/mL.

15. CARATTERISTICHE SPECIFICHE DELLE PERFORMANCE

15.1 Precisione

Variazione intra-analisi (valori = pg/mL). Tre controlli sul siero sono stati eseguiti in due serie di 20 in una singola analisi per stabilire la variazione durante la stessa analisi.

Numero campione	Valore medio	D.S.	(% C.V.)
1	26	0,9	3,6
2	276	5,4	2,0
3	1,125	27,5	2,4

Variazione inter-analisi (valori = pg/mL). Tre controlli sul siero sono stati eseguiti da 4 tecnici in 20 analisi separate per stabilire la variazione fra le analisi.

Numero campione	Valore medio	D.S.	(% C.V.)
1	49	1,6	3,4
2	285	13,1	4,6
3	1,111	54,8	4,9

15.2 Accuratezza: l'accuratezza dell'analisi è stata controllata mediante test di diluizione e test di recupero.

Parallelismo
Studio di diluizione seriale di 3 campioni non noti (valori = pg/mL) (campioni diluiti con calibratore 0).

Numero campione	Diluizione	Misurato	Corretto per diluizione	% ottenuta
1	Non diluito	164	-------	100%
	1:2	77	154	94%
	1:4	36	144	87%
	1:8	19	152	93%
2	Non diluito	286	-------	100%
	1:2	139	278	97%
	1:4	72	288	100%
	1:8	36	288	101%
3	Non diluito	750	-------	100%
	1:2	357	714	95%
	1:4	184	736	98%
	1:8	100	800	106%

PRECISIONE
Studio del recupero (valori = pg/mL)

Valore di fondo	Calibratore aggiunto	Valore previsto	Valore misurato	Percentuale di recupero
Set N. 1				
24,3	50	74,3	77,9	107
24,3	150	174,3	186,3	108
24,3	450	474,3	464	98
Set N. 2				
17,7	50	67,7	69,5	104
17,7	150	167,7	177,6	107
17,7	450	467,7	471,7	101
Set N. 3				
19,5	50	69,5	72,4	106
19,5	150	169,5	179,4	107
19,5	450	469,5	461,2	98
Set N. 4				
10,6	50	60,6	60,4	100
10,6	150	160,6	163,9	102
10,6	450	460,6	435,8	94

15.3 Sensibilità analitica

La quantità minima rilevabile, se definita come concentrazione apparente a 2 deviazioni standard dai conteggi a legame minimo, è di 0,7 pg/mL.

15.4 Specificità analitica

La reattività incrociata del sistema N-tact PTH SP è stata eseguita con i seguenti frammenti di PTH umano a 200.000 pg/mL.

Frammento	% di reattività incrociata
hPTH 39-84	<0,1
hPTH 53-84	<0,1
hPTH 39-68	<0,1
hPTH 44-68	<0,1
hPTH 1-34	<0,1
hPTH 13-34	<0,1
hPTH 1-84	100,0

FARE RIFERIMENTO ALL'ULTIMA PAGINA PER LA BIBLIOGRAFIA

SCHEMA DI ANALISI

1. Ricostituire i reagenti liofilizzati e lasciar scongelare completamente eventuali campioni surgelati. Tenere i reagenti e i campioni congelati sul ghiaccio mentre si prepara l'analisi.
2. Contrassegnare due serie di provette.
3. Versare il reagente seguendo lo schema seguente:

Provette/Reagenti	Conteggi totali	Cal 0-5	Controllo e campioni non noti
Calibratori	-	200 µL	-
Controlli	-	-	200 µL
Campioni non noti	-	-	200 µL
Tracciatore	100 µL	100 µL	100 µL

4. Mescolare bene.
5. Distribuire 1 granulo in ogni provetta.
6. Coprire le provette con pellicola, lasciare in incubazione per 22 ore (+/- 2ore) a 20 - 25 °C.
7. Aspirare da ogni provetta la miscela di reazione.
8. Lavare energicamente i granuli versando 1 mL di soluzione di lavaggio in ogni provetta con una forza sufficiente a sollevare i granuli dal fondo della provetta. Aspirare la soluzione di lavaggio. Ripetere tre volte la procedura di lavaggio.
9. Contare ogni provetta in un contatore a raggi gamma.

ENSAIO IMUNORADIOMÉTRICO DA HORMONA PARATIRÓIDE N-TACT®

1. USO INDICADO

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO.

Este kit contém instruções e materiais para a determinação quantitativa da hormona paratiróide humana intacta biologicamente activa (hPTH 1-84) no soro ou plasma através de ensaio imunoradiométrico (IRMA).

2. RESUMO E EXPLICAÇÃO

A manutenção de níveis de cálcio adequados nas células e nos fluidos extracelulares é de importância fundamental para vários processos biológicos, e a hormona paratiróide (PTH) é um dos reguladores mais importantes da homeostase do cálcio.

Clinicamente, a medição da PTH é usada em conjunto com determinações relativas ao cálcio para avaliar distúrbios no metabolismo do cálcio.[1-3] A medição da PTH provou ser complicada devido à heterogeneidade de peptídeos que ocorrem tanto na glândula como na circulação.[4]

A PTH é sintetizada na glândula paratiróide como um aminoácido 115 precursor designado como hormona pre-proPTH. A hormona pré-pró-PTH é convertida numa forma intermediária de 90 aminoácidos hormona pró-PTH.[5] Uma acção proteolítica adicional converte a hormona intermediária na biologicamente activa PTH 1-84.[6] Além da formação de fragmentos dentro da glândula, há uma quebra proteolítica adicional da PTH assim que é libertada na circulação.[7, 8]

Estudos científicos indicam que só a PTH intacta e os fragmentos de PTH com a sequência 1-34 de aminoácidos possuem actividade biológica. As concentrações insignificantes do(s) fragmento(s) N-terminal contribuem para a bolsa circulatória da hormona paratiróide imunoreactiva. Assim, ao usar os níveis da PTH para avaliar pacientes, a medição da PTH intacta correlaciona-se melhor com o seu estado de metabolismo do cálcio.[9-13]

A hormona paratiróide e os seus fragmentos são eliminados da circulação pelo fígado e pelos rins.[14] A eliminação dos fragmentos C-terminal é mais lenta do que a eliminação da hormona intacta, estando mais dependente dos mecanismos renais.[15] Em pacientes com insuficiência renal grave ou em fase terminal, os fragmentos C-terminal acumulam-se em níveis muito altos. Ao usar um ensaio PTH específico de C-terminal, é possível encontrar concentrações elevadas da PTH graças, principalmente, à reduzida eliminação destes fragmentos biologicamente inactivos, que complica a diferenciação da hipercalcemia.[8,16-18]

3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O ensaio imunoradiométrico da PTH SP intacta (IRMA) da DiaSorin utiliza 2 anticorpos policlonais diferentes que foram purificados através da cromatografia de afinidade. Estes anticorpos purificados são específicos para duas regiões diferentes da molécula da PTH.

O primeiro anticorpo, específico para a PTH 39-84, está ligado a uma fase sólida (esférulas de poliestireno). O segundo anticorpo é específico para a PTH 1-34 e é rotulado com iodo-125. As amostras são incubadas simultaneamente em ambos os anticorpos. A PTH 1-84 intacta contém tanto as sequências de aminoácidos 1-34 como as de 39-84 sendo a única forma da PTH que será ligada pelo anticorpo nas esférulas e no anticorpo rotulado com iodo-125.

Como o anticorpo ligado à fase sólida é específico para os fragmentos medianos e C-terminal assim como para a PTH intacta, a capacidade da fase sólida foi projectada para acomodar níveis bastante elevados da PTH. Isto evita a interferência de fragmentos PTH medianos e C-terminal extremamente elevados em amostras desconhecidas.

Após o período de incubação, cada esférula é lavada para remover qualquer anticorpo rotulado não ligado. A radioactividade presente no anticorpo rotulado ligado restante é então medida usando um contador gama.

As concentrações da PTH intacta presentes nas amostras são directamente proporcionais à radioactividade medida.

4. REAGENTES FORNECIDOS NO KIT

Calibrador 0 N-Tact PTH SP Calibradores 1-5 N-Tact PTH SP Esférulas N-Tact PTH SP Anticorpo ^{125}I N-Tact PTH SP Solução de lavagem conc. N-Tact PTH SP Controlos N-Tact PTH SP	1 frasco/15 mL 5 frascos/2,0 mL 1 recipiente/100 esférulas 2 frascos/5 mL 1 frasco/50 mL 2 frascos/ 2,0 mL
Número de testes	100

ARMAZENAMENTO: Ao ser recebido, o kit deve ser armazenado a 2-8 °C. Depois de abrir, armazene cada reagente a 2-8° até à data de validade no rótulo. Os reagentes não devem ser usados após a data de validade. A data de validade do kit é indicada no rótulo externo e corresponde à data de validade do traçador.

Ao reconstituir o conteúdo dos frascos, misture com cuidado para evitar a formação de espuma. Armazene todos os reagentes reconstituídos a -15 °C ou menos imediatamente após o uso. Não misture reagentes de lotes diferentes.

4.1 Calibrador 0 N-tact PTH SP: reagente pronto a usar
Contém soro humano com 0,1% de azida de sódio adicionado como preservativo.

4.2 Calibradores 1-5 N-tact PTH SP: reagente liofilizado
Conjunto de 5 calibradores PTH 1-84 humano, em concentrações nominais variando entre 15-2000 pg/mL, contém 0,1% de azida de sódio e outros estabilizadores. Os valores exactos de concentração são atribuídos a cada lote. Reconstitua cada frasco de calibrador liofilizado com 2.0 mL do calibrador 0 fornecido, misture e deixe descansar durante 5 minutos a 2-8 °C ou até que o conteúdo esteja completamente dissolvido.
Os calibradores do kit são calibrados usando PTH humana sintética. Os calibradores do kit demonstram permutabilidade com amostras de pacientes quando usados com reagentes e um procedimento operacional deste teste de diagnóstico in vitro tal como recomendado.

4.3 Esférulas N-tact PTH SP: reagente pronto a usar
As esférulas de poliestireno são revestidas com anticorpo de cabra purificado por afinidade específico para a sequência 39-84 da PTH.

4.4 ^{125}I Anticorpo N-tact PTH SP: reagente pronto a usar
Cada frasco contém 5,0 mL de anticorpo de cabra purificado por afinidade específico para PTH 1-34, rotulada com iodo-125. O anticorpo rotulado é diluído em soro com tampão contendo corante vermelho e 0,1% de azida de sódio.

4.5 Solução de lavagem concentrada N-tact PTH SP: reagente em solução
Contém um surfactante concentrado tamponado. Prepare uma solução de lavagem de trabalho diluindo todo o conteúdo do frasco em 450 mL de água destilada ou deionizada. Armazene a solução de lavagem à temperatura ambiente.

4.6 Controlo N-tact PTH SP, Nível 1 e Nível 2: reagente liofilizado
O soro humano é fixado com hPTH 1-84 para obter uma concentração dentro de um determinado intervalo. Adicione 0,1% de azida de sódio. Reconstitua cada controlo liofilizado com 2,0 mL de água destilada ou deionizada, misture e deixe descansar a 2-8 °C até que o conteúdo esteja completamente dissolvido. Os intervalos para cada lote estão impressos nos frascos do controlo.

5. AVISOS E PRECAUÇÕES

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO.
Não recomendado para o uso interno ou externo em seres humanos ou animais.

REAGENTES COM MATERIAL DE FONTE HUMANA

Trate como se fossem potencialmente infecciosos.

Cada unidade de doador de soro/plasma usados na preparação deste produto foi testado por um método aprovado pelo FDA americano e determinado como sendo não reactivo para a presença de HBsAg, anticorpo para HCV e anticorpo para HIV 1/2. Embora estes métodos sejam bastante precisos, não garantem que todas as unidades infectadas sejam detectadas. Este produto também pode conter outros materiais de origem humana para os quais não há teste aprovado. Como nenhum método de teste conhecido pode oferecer segurança total em relação à ausência do vírus da hepatite B (HBV), do vírus da hepatite C (HCV), do vírus HIV ou de outros agentes infecciosos, todos os produtos que contêm materiais de origem humana devem ser manuseados de acordo com boas práticas laboratoriais usando as precauções adequadas tal como descrito no Manual dos Centros Americanos para Controlo e Prevenção de Doenças e Institutos Nacionais de Saúde, "Biosegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos," (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories), 4ª edição, Maio 1999, ou edição actual.

REAGENTES COM AZIDA DE SÓDIO

CUIDADO: Alguns reagentes presentes neste kit contêm azida de sódio. A azida de sódio pode reagir com chumbo ou cobre para formar azidas de metal altamente explosivo. Ao eliminar, lave com grande quantidade de água para impedir a formação de azida. Para mais informações, consulte "Descontaminação de drenos de pias para remover Sais de azidas," no Manual Guia-Gestão de Segurança Nº CDC-22 emitido pelos Centros de Controlo e Prevenção de Doenças, Atlanta, GA, 1976.

Frases de Risco de Substâncias Perigosas da Comunidade Europeia (Directiva do Conselho 1999/45/EC)
R 20/21/22 - Nocivo pela inalação, em contacto com a pele e se ingerido.
R 32 – O contacto com ácidos liberta gás muito tóxico.
S28 - Após contacto com a pele, lave imediatamente com água em abundância.

REAGENTES COM IODO-125

Este kit contém material radioactivo que não excede 20µCi (740kBq) de iodo-125. Devem ser tomadas todas as precauções apropriadas e usadas boas práticas laboratoriais no armazenamento, manuseio e eliminação deste material.
Para médicos ou instituições que recebem rádio-isótopos sob uma licença geral:
Este material radioactivo pode ser recebido, adquirido, possuído e usado apenas por médicos, veterinários na prática da medicina veterinária, laboratórios clínicos e hospitais, e apenas para testes laboratoriais ou testes clínicos in vitro que não envolvam administração interna ou externa do material, ou a radiação deste para seres humanos ou animais. A sua recepção, aquisição, posse, uso e transferência estão sujeitos aos regulamentos e à licença geral da Comissão Reguladora Nuclear dos Estados Unidos do estado com o qual a Comissão entrou em acordo para o exercício da autoridade reguladora.

1. O armazenamento de qualquer material radioactivo deve ser limitado a uma área especificamente designada.
2. O acesso a materiais radioactivos deve ser limitado apenas a pessoal autorizado.
3. Não pipete material radioactivo por via oral.
4. Não coma nem beba nas áreas designadas para trabalho radioactivo.

5. As áreas onde possam ocorrer fugas devem ser limpas e em seguidas lavadas com detergente álcali ou solução de descontaminação radiológica. Qualquer vidro usado deve ser enxaguado completamente em água antes de lavar qualquer outro material de vidro do laboratório.

Para médicos ou instituições que recebem rádio-isótopos sob uma licença específica: A recepção, uso, transferência e eliminação de materiais radioactivos estão sujeitos aos regulamentos e condições da sua licença específica.

ADVERTÊNCIA: Este produto contém um elemento químico que provoca cancro, segundo o Estado da Califórnia.

ATENÇÃO: O símbolo de radioactividade impresso na embalagem pode ser ligeiramente diferente do símbolo impresso no rótulo da caixa e no rótulo do frasco do traçador. O rótulo da caixa e do frasco do traçador indicam a quantidade real de radioactividade na data da calibragem enquanto a embalagem indica a radioactividade teórica no kit.

6. INDICAÇÕES DE POSSÍVEL DETERIORAÇÃO DOS REAGENTES DO KIT

6.1 Um deslocamento na inclinação ou na posição da curva do calibrador em relação à que é normalmente obtida.

6.2 Uma diminuição na ligação máxima.

6.3 Uma ligação zero não específica alta.

6.4 Valores duplicados pequenos.

7. RECOLHA E PREPARAÇÃO DE ESPÉCIMES

São necessários duzentos microlitros de soro ou plasma EDTA, em dose dupla, para usar no ensaio N-tact PTH SP.

Pode-se usar tanto soro humano como plasma neste kit. Os anticoagulantes EDTA podem ser usados com este ensaio. Recomenda-se o uso de um espécime em jejum, mas não é necessário. O sangue deve ser recolhido assepticamente por venipunctura num tubo de vidro vazio de 5 ou 10 mL. Deixe o sangue coagular à temperatura ambiente (15-25 °C). Centrifugue durante 15 minutos usando aproximadamente 760 x g* para obter soro sem hemólise. Não são necessários aditivos ou preservativos para manter a integridade da amostra. Qualquer plástico, vidro ou outro material que entrar em contacto com o espécime deve estar completamente descontaminado. Armazene as amostras de soro ou plasma à temperatura de -20 °C ou inferior. Os espécimes podem ser armazenados em frascos de vidro ou de plástico, desde que os frascos sejam hermeticamente fechados para impedir a dissecação da amostra.

As amostras de soro e plasma EDTA normal foram comparadas pelos laboratórios DiaSorin. Não se verificou nenhuma diferença significativa nos valores.

8. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

8.1 Reconstitua os reagentes liofilizados e deixe qualquer espécime congelado descongelar completamente. Mantenha os reagentes e espécimes descongelados no gelo enquanto prepara o ensaio.

8.2 Prepare dois tubos de vidro de borosilicato de 12 x 75 mm rotulados de acordo com o Esquema do Ensaio.

8.3 Adicione reagentes aos tubos da seguinte forma:

a. Total de tubos de contagem
100 µL anticorpo ^{125}I N-tact PTH SP (vermelho)

b. Calibrador 0
200 µL calibrador 0
100 µL anticorpo ^{125}I N-tact PTH SP (vermelho)

*g = (1118 x 10^{-8}) (raio em cm) (rpm)^2

c. **Calibradores (1-5)**
200 µL calibrador
100 µL anticorpo ^{125}I N-tact PTH SP (vermelho)

d. **Controlos e amostras desconhecidas**
Amostra de 200 µL
100 µL anticorpo ^{125}I N-tact PTH SP (vermelho)

8.4 Misture todos os tubos.

8.5 Despeje uma esférula em cada tubo com fórceps revestido a teflon ou um doseador adequado para manipular esférulas. (Não use os dedos.)

8.6 Cubra os tubos com parafilme ou equivalente.

8.7 Incube os tubos durante 22 (±2) horas a 20-25 °C.

8.8 Aspire a mistura de reacção de cada tubo.

8.9 Lave as esférulas deitando vigorosamente 1 mL de solução de lavagem em cada tubo com força suficiente para levantar a esférula do fundo do tubo de ensaio. Aspire a solução de lavagem. Repita o procedimento de lavagem 3 vezes.

8.10 Meça a radioactividade presente em cada tubo usando um contador gama.

9. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

9.1 Tubos de vidro descartáveis de borosilicato, 12 x 75 mm.

9.2 Suporte do tubo de ensaio.

9.3 Contador gama capaz de contar iodo-125.

9.4 Misturador de vórtice.

9.5 Dispositivos para pipetar

a. Micropipetador calibrado para administrar 200 µL.

b. Distribuidores de repetição, calibrados para administrar 100 µL e 1 mL.

c. Pipetas volumétricas para reconstituir controlos e calibradores.

9.6 Parafilme ou equivalente para cobrir os tubos de ensaio.

9.7 Fórceps revestido a teflon ou outro dispositivo aprovado para despejar esférulas.

9.8 Unidade de aspiração para aspirar anticorpo ^{125}I e soluções de lavagem.

10. COMENTÁRIOS SOBRE O PROCEDIMENTO

10.1 Ao adicionar esférulas aos tubos, incline levemente o suporte do tubo de ensaio e deixe as esférulas rolarem para dentro dos tubos. Evitará a ocorrência de respingos excessivos da solução de teste. Não manipule as esférulas com os dedos.

10.2 Pipete o anticorpo ^{125}I para a terça parte inferior do tubo de ensaio.

10.3 Para um laboratório monitorizar completamente o desempenho consistente de um ensaio RIA há alguns factores adicionais que devem ser verificados. A DiaSorin sugere a verificação para cada ensaio dos seguintes parâmetros para assegurar um desempenho consistente do kit.

a. Contagens totais

b. Ligação máxima
Contagens por minuto (CPM) de 2000 Tubo Calibrador

c. Ligação não específica
CPM do Tubo calibrador 0

*g = (1118×10^{-8}) (raio em cm) $(\text{rpm})^2$

11. CONTROLO DE QUALIDADE

Cada laboratório deve incluir ambos os soros de controlo do kit em cada ensaio para assegurar a validade dos resultados de cada ensaio. Deve-se então determinar o desvio médio e o desvio padrão para cada controlo usando um mínimo de dez (10) ensaios. Pode-se então obter um intervalo aceitável de valores para esses controlos usando ±2 desvios padrão dos valores previamente determinados. O Laboratório de Controlo de Qualidade da DiaSorin determinou um intervalo para os controlos incluídos neste kit.

12. CÁLCULO DE RESULTADOS

Para determinar a concentração de PTH intacta encontrada nas amostras desconhecidas e de controlo, prepara-se uma curva do calibrador usando concentrações do calibrador registadas nos rótulos dos frascos. Os valores são gerados da seguinte forma:

12.1 Calcule o CPM médio para cada calibrador, controlo e amostra desconhecida.

12.2 Subtraia o CPM médio dos tubos do calibrador 0 de todas as outras contagens médias para obter os CPMs corrigidos.

12.3 Usando papel de gráfico log-log, determine o CPM corrigido de cada nível de calibrador na ordenada relativamente à concentração do calibrador na abcissa.

12.4 Interpole os níveis de PTH nas amostras a partir do gráfico.

12.5 Se uma amostra desconhecida apresentar uma leitura maior do que o calibrador mais alto, deve ser apropriadamente diluída com o calibrador 0 e testada novamente.

12.6 Se uma amostra desconhecida tiver sido diluída, corrija para o factor de diluição apropriado.

12.7 Os valores menores que o Calibrador 1 mas maiores que 0,7 pg/mL (sensibilidade do ensaio) podem ser calculados usando a fórmula:

$$\text{Valores de desconhecido} = \frac{\text{CPM corrigido (desconhecido)}}{\text{CPM Corrigido (Cal. 1)}} \times \text{Valor do Cal. 1}$$

TABELA I

Dados de amostra N-tact PTH SP

Tubo	CPM Duplicado	CPM Médio	CPM Corrigido	Conc. (pg/mL)	B/T
Contagem total	260.242 253,536	256.889			
Calibrador 0	384 374	379			
Calibradores (pg/mL)					
1 (15)	2.324 2,351	2.338	1.959		
2 (50)	6.469 6,630	6.550	6.171		
3 (150)	16.390 16,289	16.340	15.961		
4 (450)	34.605 35,246	34.926	34.547		
5 (2.000)	85.678 84.050	84.864	84.485		33%
Amostras desconhecidas					
1	6.494 6,450	6.472	6.093	49	
2	34.144 34,932	34.538	34.159	442	

A TABELA 1 e a FIGURA 1 apresentam os dados típicos de calibragem e uma curva do calibrador para a PTH SP intacta; estas informações são apenas para referência e não devem ser usadas para o cálculo de nenhum valor.

CURVA DO CALIBRADOR DE AMOSTRA N-tact PTH SP

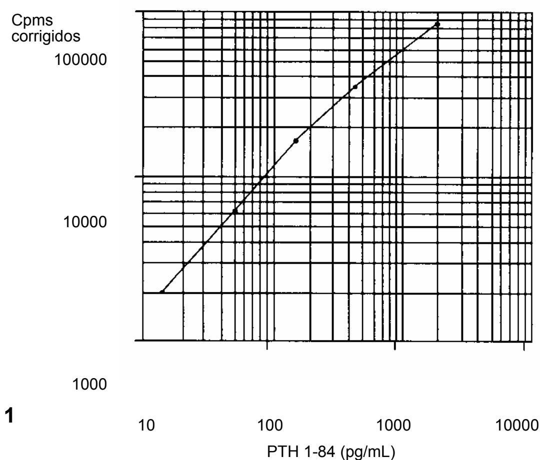


FIGURA 1

13. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

13.1 Se a concentração inicial de uma amostra desconhecida for maior do que o calibrador mais alto, dilua apenas com Calibrador 0.

13.2 Devem ser feitas contagens suficientes para reduzir o erro estatístico (por exemplo, a acumulação de 2.000 CPM levará a um erro de 5%; 10.000 CPM levará a um erro de 1%).

DADOS DE REDUÇÃO

O Laboratório de controlo de qualidade da DiaSorin usa um ajuste de curva spline suave.

14. VALORES ESPERADOS

INTERVALO NORMAL

Cada laboratório deve estabelecer o seu próprio intervalo normal. Um intervalo normal foi estabelecido pela DiaSorin usando soro de 129 adultos aparentemente saudáveis em jejum. A média geométrica foi calculada como sendo 26 pg/mL com um intervalo 2 desvio padrão de 13-54 pg/mL.

ESPÉCIMES CLÍNICOS

1. Amostras de soro de quarenta e seis (46) pacientes com hiperparatiroidismo foram analisadas no sistema de ensaio N-tact PTH SP. Os valores da PTH intacta variaram entre 43,6-686,1 pg/mL.
2. Catorze (14) amostras de pacientes diagnosticados como portadores de hipoparatiroidismo foram analisadas no sistema de ensaio N-tact PTH SP. Os valores de PTH intacto variaram entre 0-20,6 pg/mL.
3. Quarenta e oito (48) pacientes com doença renal crónica foram analisados no sistema de ensaio N-tact PTH SP. Os valores da PTH intacta variaram entre 10,3-1042 pg/mL.
4. Quatro (4) amostras de pacientes com hiperparatiroidismo familiar foram analisadas no sistema de ensaio N-tact PTH SP. Os valores da PTH intacta variaram entre 59,5-100,5 pg/mL.

15. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

15.1 Precisão

Variação intra ensaio (valores = pg/mL). Foram executados três controlos de soro em réplicas de 20 num único ensaio para determinar a variação inter-ensaio.

Número da amostra	Valor médio	Desvio padrão	(% C.V.)
1	26	0.9	3.6
2	276	5.4	2.0
3	1,125	27.5	2.4

Variação intra ensaio (valores = pg/mL). Foram executados três controlos de soro por 4 técnicos em 20 ensaios separados para determinar a variação intra-ensaio.

Número da amostra	Valor médio	Desvio padrão	(% C.V.)
1	49	1.6	3.4
2	285	13.1	4.6
3	1,111	54.8	4.9

15.2 Precisão: A precisão do ensaio foi verificada através do teste de diluição e do teste de recuperação.

Paralelismo

Estudo em série da diluição de 3 amostras desconhecidas (valores = pg/mL). (Amostras diluídas com calibrador 0 .)

Número da amostra	Diluição	Medida	Corrigida para diluição	% Obtida
1	Não diluído	164	-------	100%
	1:2	77	154	94%
	1:4	36	144	87%
	1:8	19	152	93%
2	Não diluído	286	-------	100%
	1:2	139	278	97%
	1:4	72	288	100%
	1:8	36	288	101%
3	Não diluído	750	-------	100%
	1:2	357	714	95%
	1:4	184	736	98%
	1:8	100	800	106%

PRECISÃO

Estudo de recuperação (valores = pg/mL)

Valor base	Calibrador adicionado	Valor esperado	Valor medido	Percentagem de recuperação
Conjunto No. 1				
24,3	50	74,3	77,9	107
24,3	150	174,3	186,3	108
24,3	450	474,3	464	98
Conjunto No. 2				
17,7	50	67,7	69,5	104
17,7	150	167,7	177,6	107
17,7	450	467,7	471,7	101
Conjunto No. 3				
19,5	50	69,5	72,4	106
19,5	150	169,5	179,4	107
19,5	450	469,5	461,2	98
Conjunto No. 4				
10,6	50	60,6	60,4	100
10,6	150	160,6	163,9	102
10,6	450	460,6	435,8	94

15.3 Sensibilidade Analítica

Quando definida como a concentração aparente em 2 desvios-padrão das contagens na ligação mínima, a quantidade mínima detectável é de 0,7 pg/mL.

15.4 Especificidade Analítica

A reactividade cruzada do sistema N-tact PTH SP foi feita com os seguintes fragmentos humanos da PTH a 200.000 pg/mL.

Fragmento	% Reactividade cruzada
hPTH 39-84	<0,1
hPTH 53-84	<0,1
hPTH 39-68	<0,1
hPTH 44-68	<0,1
hPTH 1-34	<0,1
hPTH 13-34	<0,1
hPTH 1-84	100,0

CONSULTE A ÚLTIMA PÁGINA PARA OBTER REFERÊNCIAS

ESQUEMA DO ENSAIO

1. Reconstitua os reagentes liofilizados e deixe descongelar totalmente qualquer espécime congelado. Mantenha os reagentes e espécimes descongelados no gelo enquanto prepara o ensaio.
2. Identifique dois tubos.
3. Despeje os reagentes de acordo com o seguinte esquema:

Tubos/Reagentes	Contagens totais	Cal 0-5	Amostras de controlo e desconhecidas
Calibradores	-	200 µL	-
Controlos	-	-	200 µL
Amostras desconhecidas	-	-	200 µL
Traçador	100 µL	100 µL	100 µL

4. Misture bem.
5. Despeje uma esférula em todos os tubos.
6. Tape os tubos com parafilme, incube durante 22 horas (+/- 2 horas) a 20 - 25 °C.
7. Aspire a mistura de reacção de cada tubo.
8 Lave as esférulas deitando vigorosamente 1 mL de solução de lavagem em cada tubo com força suficiente para levantar a esférula do fundo do tubo de ensaio. Aspire a solução de lavagem. Repita o procedimento de lavagem 3 vezes.
9. Conte cada tubo num contador gama.

N-TACT® IMMUNRADIOMETRISK ASSAY FÖR PARATHORMON

1. AVSEDD ANVÄNDNING

FÖR DIAGNOSTISKT BRUK IN VITRO.

Satsen innehåller anvisningar och materiel för kvantitativ analys av biologiskt aktivt intakt humant parathormon (hPTH 1-84) i serum eller plasma med en immunradiometrisk assay (IRMA).

2. SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Upprätthållandet av korrekta kalciumhalter i celler och extracellulära vätskor är av grundläggande betydelse för många biologiska processer, och parathormon (PTH) är en av de viktigaste regulatorerna av kalciumhomeostasen.

Kliniskt används PTH-mätningar tillsammans med analyser av kalcium för att bedöma rubbningar i kalciummetabolismen.[1-3] Det har dock visat sig svårt att mäta PTH p.g.a. heterogeniteten hos de peptider som förekommer både i körtlar och cirkulation.[4]

PTH syntetiseras i bisköldkörtlarna som en 115 aminosyror lång prekursor, vilken kallas preproparathormon. Preproparathormon omvandlas till en intermediär form med 90 aminosyror, proparathormon.[5] Genom fortsatt proteolytisk aktivitet omvandlas intermediärhormonet till biologiskt aktivt PTH 1-84.[6] Utöver att det bildas fragment i körtlarna sker det en fortsatt proteolytisk nedbrytning av PTH sedan det frisatts till blodbanan.[7, 8]

Vetenskapliga studier har visat att endast intakt PTH och PTH-fragment som innehåller aminosyrorna 1-34 har biologisk aktivitet. Obetydliga halter av det/de N-terminala fragmenten bidrar till poolen av immunreaktivt parathormon i cirkulationen. När man mäter PTH för att bedöma patienter är det därför mätning av intakt PTH som bäst korrelerar med status för patientens kalciummetabolism.[9-13]

Parathormon och fragmenten av detta elimineras från cirkulationen av både njurar och lever.[14] Clearance för C-terminala fragment är långsammare än clearance för det intakta hormonet och är mer beroende av renala mekanismer.[15] Hos patienter med svår njursvikt eller terminal njursvikt ackumuleras de C-terminala fragmenten till mycket höga nivåer. När man använder en C-terminalspecifik PTH-assay, kan man ibland påvisa förhöjda PTH-halter enbart p.g.a. en sänkt clearance för dessa biologiskt inaktiva fragment, vilket komplicerar differentialdiagnostiken av hyperkalcemi.[8,16-18]

3. ANALYSPRINCIP

DiaSorin immunradiometrisk assay (IRMA) för intakt PTH SP är baserad på två olika polyklonala antikroppar renade med hjälp av affinitetskromatografi, som har specificitet för två olika områden på PTH-molekylen.

Den första antikroppen, som är specifik för PTH 39-84, är bunden till en fast fas (polystyrenpärlor). Den andra antikroppen är specifik för PTH 1-34 och är inmärkt med jod-125. Proverna inkuberas med båda antikropparna på en och samma gång. Intakt PTH 1-84 innehåller både aminosyrasekvensen 1-34 och aminosyrasekvensen 39-84 och är den enda form av PTH som binds både av den antikropp som är bunden till pärlorna och av den som är inmärkt med jod-125.

Eftersom den antikropp som är bunden till den fasta fasen har specificitet för såväl intakt PTH som fragment från C-terminal och mittregion, har vi sett till att den fasta fasen har tillräckligt hög kapacitet för att binda mycket höga halter av PTH. Därigenom förhindrar man störningar från extremt höga halter av fragment från C-terminal och mittregion i okända prover.

Efter avslutad inkubation tvättas varje pärla så att obundna inmärkta antikroppar avlägsnas. Därefter mäts radioaktiviteten i den kvarvarande mängden bunden inmärkt antikropp med en gammaräknare.

Halten intakt PTH i provet är direkt proportionell mot den uppmätta radioaktiviteten.

4. REAGENS I FÖRPACKNINGEN

N-Tact PTH SP kalibreringslösning 0	1 flaska/15 mL
N-Tact PTH SP kalibreringslösning 1-5	5 flaskor/2,0 mL
N-Tact PTH SP pärlor	1 burk/100 pärlor
^{125}I N-Tact PTH SP antikropp	2 flaskor/5 mL
N-Tact PTH SP tvättlösningskonc.	1 flaska/50 mL
N-Tact PTH SP kontroller	2 flaskor/ 2,0 mL
Antal test	100

FÖRVARING: Oöppnad förpackning förvaras vid 2-8 °C. När förpackningen öppnats förvaras varje reagens vid 2-8° till det utgångsdatum som anges på etiketten. Reagensen får ej användas efter utgångsdatum. Utgångsdatum för satsen anges på etiketten på ytterförpackningen och motsvarar utgångsdatum för spårämnet.

När man rekonstituerar innehållet i flaskorna måste man blanda försiktigt för att undvika skumbildning. Alla rekonstituerade reagens skall förvaras vid -15 °C eller lägre omedelbart efter användning. Reagens från skilda batcher får ej blandas.

4.1 N-tact PTH SP kalibreringslösning 0: reagens färdigt för användning
Innehåller humant serum med tillsats av 0,1 % natriumazid som konserveringsmedel.

4.2 N-tact PTH SP kalibreringslösning 1-5: frystorkade reagens
Sats om 5 kalibreringslösningar för humant PTH 1-84 med nominella halter i området 15-2000 pg/mL, innehåller 0,1 % natriumazid och andra stabiliserande ämnen. De exakta koncentrationsvärdena anges för varje batch. Rekonstituera varje flaska med frystorkad kalibreringslösning med 2,0 mL av den bifogade 0-kalibreringslösningen, blanda genom att försiktigt svänga runt flaskan och låt lösningarna stå i 5 minuter vid 2-8 °C eller tills innehållet är fullständigt upplöst. Kalibreringslösningarna i satsen har kalibrerats med hjälp av syntetiskt humant PTH. Kalibreringslösningarna i satsen kan betraktas som likvärdiga med patientprover, när de används med de reagens och metodanvisningar om rekommenderas för detta diagnostiska in vitro-test.

4.3 N-tact PTH SP pärlor: reagens färdigt för användning
Polystyrenpärlorna är belagda med affinitetsrenad getantikropp specifik för sekvensen 39-84 i PTH.

4.4 ^{125}I N-tact PTH SP antikropp: reagens färdigt för användning
Varje flaska innehåller 5,0 mL affinitetsrenad getantikropp specifik för PTH 1-34, inmärkt med jod-125. Den inmärkta antikroppen är löst i buffrat serum med tillsats av ett rött färgämne och 0,1 % natriumazid.

4.5 N-tact PTH SP tvättlösningskoncentrat: reagens i lösning
Innehåller ett koncentrerat buffrat ytaktivt ämne. Bered en brukstvättlösning genom att späda hela innehållet i flaskan med 450 mL destillerat eller avjonat vatten. Förvara brukstvättlösningen vid rumstemperatur.

4.6 N-tact PTH SP kontroll, nivå 1 och nivå 2: frystorkade reagens
Humant serum med tillsats av hPTH 1-84 så att man erhållit koncentrationer inom ett angivet område. Med tillsats av 0,1% natriumazid. Rekonstituera varje frystorkad kontroll med 2,0 mL destillerat eller avjonat vatten, blanda och låt stå vid 2-8 °C tills innehållet är fullständigt upplöst. Det specifika området för varje batch anges på flaskorna med kontroller.

5. VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

FÖR DIAGNOSTISKT BRUK IN VITRO.
Ej avsett för vare sig invärtes eller utvärtes bruk på människor eller djur.

REAGENS SOM INNEHÅLLER MATERIAL AV HUMANT URSPRUNG

Behandlas som potentiellt smittfarligt.

Varje donerad enhet serum/plasma som använts för beredning av produkten har testats med en metod godkänd av USA:s läkemedelsverk FDA, som funnit att den ej påverkas av HBsAg, antikroppar mot HCV eller antikroppar mot HIV 1/2. Även om dessa metoder är mycket tillförlitliga, utgör de ingen garanti för att samtliga infekterade enheter upptäcks. Produkten kan även innehålla annat material av humant ursprung för vilket det inte finns något godkänt test. Eftersom ingen känd testmetod kan ge en fullständig garanti för att det inte förekommer hepatit-B-virus (HBV), hepatit-C-virus (HCV), humant immunbristvirus (HIV) eller andra infektiösa agens, skall alla produkter som innehåller material av humant ursprung hanteras i enlighet med god laboratoriepraxis och med lämpliga försiktighetsåtgärder enligt handboken "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" från U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health, 4:e upplagan, maj 1999, eller aktuell upplaga.

REAGENS SOM INNEHÅLLER NATRIUMAZID

FÖRSIKTIGT! Vissa reagens i satsen innehåller natriumazid. Natriumazid kan reagera med bly och koppar i avloppsledningarna och bilda högexplosiva metallazider. När reagensen kasseras måste man spola efter med stora mängder vatten för att förhindra att azid ackumuleras. För ytterligare information hänvisar vi till avsnittet "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" i handboken Safety Management No. CDC-22 utgiven av Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 1976.

Europeiska Gemenskapens Riskfraser för farliga preparat (EU-kommissionens direktiv 1999/45/EC)

R20/21/22 - Farligt vid inandning, hudkontakt och förtäring.
R32 - Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra.
S28 - Vid kontakt med huden tvätta genast med mycket vatten.

REAGENS SOM INNEHÅLLER JOD-125

Satsen innehåller radioaktivt material som ej överstiger 20 µCi (740 kBq) jod-125. Adekvata försiktighetsåtgärder måste vidtas och god laboratoriepraxis följas vid förvaring, hantering och kassering av detta material.

För mottagningar och institutioner som tar emot radioisotoper under en allmän licens: Detta radioaktiva material får endast tas emot, förvärvas, ägas och användas av läkare, veterinärer med praktik inom veterinärmedicin, kliniska laboratorier eller sjukhus, och får endast användas för kliniska tester in vitro eller laboratorietester in vitro, vilka ej innebär någon invärtes eller utvärtes administrering av materialet, eller av strålning från det, till människor eller djur. För mottagande, förvärv, innehav, användning och överlåtelse gäller de regler och den allmänna licens som utfärdats av den amerikanska Nuclear Regulatory Commission eller av den stat med vilken kommissionen har ingått ett avtal för utövande av regulatorisk myndighet.

1. Radioaktivt material får endast förvaras på en speciellt avsedd plats.
2. Endast auktoriserad personal får ha tillgång till radioaktivt material.
3. Pipettera aldrig radioaktivt material med munnen.
4. Undvik att äta eller dricka i lokaler där radioaktivt material används.
5. Ytor där spill kan förekomma skall torkas av och därefter rengöras med ett alkaliskt rengöringsmedel eller radiologisk dekontamineringslösning. Alla glasvaror som används måste sköljas noga med vatten innan de diskas tillsammans med andra glasvaror för laboratoriebruk.

För mottagningar och institutioner som tar emot radioisotoper under en specifik licens: När ni tar emot, använder, överlåter och kasserar radioaktivt material gäller reglerna och villkoren i er specifika licens.

VARNING! Produkten innehåller en kemikalie som enligt staten Kalifornien är känd för att orsaka cancer.

OBSERVERA! Den radioaktivitet som anges på bipacksedeln kan skilja sig något från den aktivitet som anges på etiketterna på kartongen och på flaskan med spårämnet. Etiketterna på kartongen och på flaskan med spårämnet anger den verkliga radioaktivitetsmängden vid kalibreringsdatum, medan bipacksedeln anger den teoretiska radioaktiviteten för satsen.

6. TECKEN SOM KAN TYDA PÅ EN KVALITETSFÖRSÄMRING HOS REAGENSEN I SATSEN

6.1 En förändring av kalibreringskurvans läge eller lutning jämfört med vad som normalt erhålles.

6.2 En sänkning av maximal bindning.

6.3 En hög ospecifik bindning.

6.4 Dålig överensstämmelse mellan dubbelprover.

7. PROVTAGNING OCH PROVHANTERING

Det krävs 200 µl serum eller EDTA-plasma som dubbelprover för en assay med N-tact PTH SP.

Satsen kan användas både med humant serum och human plasma. EDTA kan användas som antikoagulanstillsats med denna assay. Fasteprov rekommenderas men är ej ett krav. Blodprovet bör tas med aseptisk teknik genom venpunktion med ett 5 eller 10 mL rör av vacutainertyp. Låt blodet koagulera i rumstemperatur (15-25 °C). Centrifugera i 15 minuter vid cirka 760 x g* så att hemolysfria serumprover erhålles. Inga tillsatser eller konserveringsmedel behövs för att bibehålla intakta prover. Alla plastartiklar, glasvaror och annan materiel som kommer i kontakt med provet måste vara fullkomligt fria från kontaminerande material. Serum- eller plasmaprover kan lagras vid -20 °C eller lägre. Proverna kan förvaras i glas- eller plaströr, förutsatt att de är lufttätt förslutna så att vatten inte avdunstar.

DiaSorin har utfört jämförelser mellan normala EDTA-plasma- och serumprover. Inga signifikanta skillnader mellan mätvärdena observerades.

8. TESTPROCEDUR

8.1 Rekonstituera de frystorkade reagensen och låt eventuellt frysta prover tina fullständigt. Låt reagens och tinade prover stå på is medan assayen förbereds.

8.2 Gör i ordning märkta 12 x 75 mm rör av borosilikatglas för dubbelprov enligt lathunden för assayen.

8.3 Tillsätt reagens till rören enligt följande:

a. Rör för total aktivitet
100 µL ^{125}I N-tact PTH SP antikropp (rött)

b. kalibreringslösning 0
200 µL kalibreringslösning 0
100 µL ^{125}I N-tact PTH SP antikropp (rött)

c. kalibreringslösningar (1-5)
200 µL kalibreringslösning
100 µL ^{125}I N-tact PTH SP antikropp (rött)

*g = (1118×10^{-8}) (radie i cm) $(\text{rpm})^2$

d. Kontroller och okända prover
200 µL prov
100 µL ^{125}I N-tact PTH SP antikropp (rött)

8.4 Vortexa alla rör.

8.5 Tillsätt en pärla till varje rör med hjälp av en teflonöverdragen pincett eller annat lämpligt redskap för hantering av pärlor. (Använd inte fingrarna.)

8.6 Täck rören med parafilm eller liknande.

8.7 Inkubera rören i 22 (±2) timmar vid 20-25 °C.

8.8 Sug bort reaktionsblandningen från alla rör.

8.9 Tvätta pärlorna genom att spruta ned 1 mL tvättlösning i varje rör med så kraftig stråle att pärlan lyfts upp från provrörets botten. Sug bort tvättlösningen. Upprepa tvättproceduren 3 gånger.

8.10 Mät radioaktiviteten i varje rör med en gammaräknare.

9. EJ TILLHANDAHÅLLEN MEN NÖDVÄNDIG UTRUSTNING OCH MATERIEL

9.1 Engångs borosilikatrör, 12 x 75 mm.

9.2 Provrörsställ.

9.3 Gammaräknare som kan räkna jod-125.

9.4 Vortex-blandare.

9.5 Pipetteringshjälpmedel:

- **a.** Mikropipett kalibrerad för 200 µL.
- **b.** Repeterande dispensorer, kalibrerade för 100 µL och 1 mL.
- **c.** Mätpipetter för rekonstituering av kontroller och kalibreringslösningar.

9.6 Parafilm eller motsvarande för att täcka över provrören.

9.7 Teflonöverdragen pincett eller annat redskap för portionering av pärlor, godkänt för denna sats.

9.8 Sugapparat för att suga bort^{125}I-antikroppen och tvättlösningarna.

10. KOMMENTARER TILL PROCEDURERNA

10.1 När man tillsätter pärlor till provrören skall man luta provrörsstället en smula och låta pärlorna rulla ned i rören. På så sätt undviker man att provlösningen stänker för mycket Tag ej i pärlorna med fingrarna.

10.2 Se till att pipettmynningen befinner sig i den nedre tredjedelen av provröret när lösningen med ^{125}I-antikropp sprutas ned.

10.3 För att kontinuerligt bekräfta att ett RIA-test ger konsekventa resultat måste laboratoriet kontrollera ett antal andra faktorer. DiaSorin rekommenderar att man vid varje assay kontrollerar följande parametrar för att vara säker på att satsen ger konsekventa resultat.

a. Totalaktivitet

b. Maximal bindning
"knäpp" per minut (CPM) för röret med kalibreringslösning 2000

c. Ospecifik bindning
CPM för röret med kalibreringslösning 0

*g = (1118 x 10^{-8}) (radie i cm) (rpm)^2

11. KVALITETSKONTROLL

Alla laboratorier skall ta med båda kontrollsera i satsen vid varje assay för att säkerställa giltigheten hos resultaten från assayen. Man bör därefter beräkna medelvärde och standardavvikelse för varje kontroll baserat på minst tio (10) assayer. Man kan få fram ett godkänt område för kontrollerna genom att använda ±2 standardavvikelser för de tidigare uppmätta värdena. DiaSorin Quality Control Laboratory har bestämt ett intervall för kontrollerna i satsen.

12. RESULTATBERÄKNING

För att bestämma halten intakt PTH i okända prover och kontroller ritar man först upp en kalibreringskurva med hjälp av de halter för kontrollerna som anges på respektive flaska. Värdena erhålls på följande sätt:

12.1 Beräkna medel-CPM för varje kalibreringslösning, kontroll och okänt prov.

12.2 Subtrahera medel-CPM för rören med kalibreringslösning 0 från alla övriga medelvärden för att på så sätt få fram korrigerade CPM-värden.

12.3 Använd ett lin-log-papper och plotta det korrigerade CPM-värdet för varje kalibreringslösning (på y-axeln) avsatt mot halten i kalibreringslösningen (på x-axeln).

12.4 Rita linjen och avläs PTH-halterna i proverna.

12.5 Om ett okänt prov ger ett högre värde än den högsta kalibreringslösningen, skall provet spädas på lämpligt sätt med kalibreringslösning 0 och därefter testas på nytt.

12.6 Om ett okänt prov har spätts, korrigerar man för spädningsfaktorn.

12.7 Värden som ligger lägre än kalibreringslösning 1 men som är högre än 0,7 pg/mL (assayens känslighet) kan beräknas med följande formel:

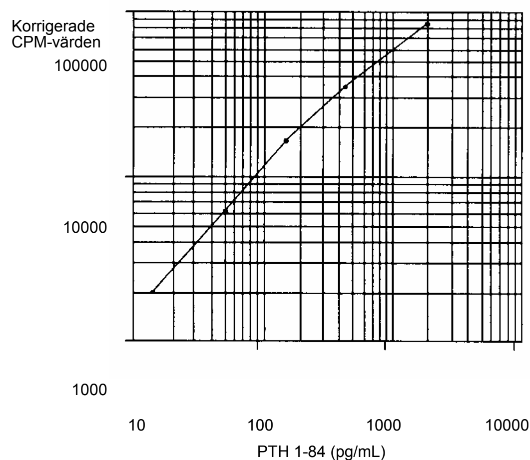
$$\text{Värdet för provet} = \frac{\text{Korrigerad CPM (okänt prov)}}{\text{Korrigerad CPM (Kal. 1)}} \times \text{Värdet för kal. 1}$$

TABELL I
Exempeldata för N-tact PTH SP

Rör	CPM för dubbelprov	Medel-CPM	Korrigerad CPM	Konc. (pg/mL)	B/T
Totalaktivitet	260 242 253,536	256 889			
Kalibreringslösning 0	384 374	379			
Kalibreringslösning (pg/mL)					
1 (15)	2 324 2,351	2 338	1 959		
2 (50)	6 469 6,630	6 550	6 171		
3 (150)	16 390 16,289	16 340	15 961		
4 (450)	34 605 35,246	34 926	34 547		
5 (2 000) 84 050	85 678	84 864	84 485		33 %
Okända prover					
1	6 494 6,450	6 472	6 093	49	
2	34 144 34,932	34 538	34 159	442	

Typiska provdata och en kalibreringskurva för intakt PTH SP visas i TABELL I och FIGUR 1; denna information är endast avsedd som ett exempel och skall inte användas för att beräkna några värden.

EXEMPEL PÅ KALIBRERINGSKURVA FÖR N-tact PTH SP



FIGUR 1

13. METODBEGRÄNSNINGAR

13.1 Om den ursprungliga halten i ett okänt prov är högre än den högsta kalibreringslösningen, skall man späda provet med enbart kalibreringslösning 0.

13.2 Aktiviteten i rören måste räknas under så lång tid att man undviker statistiska fel (till exempel ger en räkning av 2 000 CPM ett fel på 5 %; 10 000 CPM ger ett fel på 1 %).

DATAREDUKTION

DiaSorins kvalitetskontrollaboratorium använder en mjuk anpassning till SPLINE-funktioner.

14. FÖRVÄNTADE VÄRDEN

REFERENSOMRÅDE

Varje laboratorium bör upprätta ett eget referensområde. DiaSorin har fastställt ett referensområde med hjälp av serum från 129 fastande vuxna utan påtagliga hälsoproblem. Det geometriska medelvärdet beräknades till 26 pg/mL med ett intervall för 2 S.D. på 13-54 pg/mL.

KLINISKA EXEMPEL

1. Serumprover från fyrtiosex (46) patienter med primär hyperparatyreoidism analyserades med N-tact PTH SP. Värdena för intakt PTH låg i området 43,6-686,1 pg/mL.
2. Fjorton (14) prover från patienter med diagnostiserad hypoparatyreoidism analyserades med N-tact PTH SP. Värdena för intakt PTH låg i området 0-20,6 pg/mL.
3. Fyrtioåtta (48) patienter med kronisk njursjukdom analyserades med N-tact PTH SP. Värdena för intakt PTH låg i området 10,3-1042 pg/mL.
4. Fyra (4) prover från patienter med familjär hyperparatyreoidism analyserades med N-tact PTH SP. Värdena för intakt PTH låg i området 59,5-100,5 pg/mL.

15. SPECIFIKA PRESTANDA

15.1 Precision

Intraseriell variation (värden = pg/mL). Tre serumkontroller kördes som 20-faldiga prover i en enstaka assaykörning för att fastställa variationen inom en assay.

Prov nummer	Medelvärde	S.D	(% C.V.)
1	26	0,9	3,6
2	276	5,4	2,0
3	1,125	27,5	2,4

Interseriell variation (värden = pg/mL). Tre serumkontroller kördes av 4 analytiker i 20 separata assayer för att fastställa variationen mellan olika assaykörningar.

Prov nummer	Medelvärde	S.D	(% C.V.)
1	49	1,6	3,4
2	285	13,1	4,6
3	1,111	54,8	4,9

15.2 Riktighet: Riktigheten för assayen har kontrollerats med ett spädnings- och ett utbytestest.

Parallellitet

Seriell spädningsstudie på 3 okända prover (värden = pg/mL). (Proverna späddes med kalibreringslösning 0.)

Prov nummer	Spädning	Uppmätt	Korrigerat för spädning	% erhållet
1	Outspätt	164	-------	100 %
	1:2	77	154	94 %
	1:4	36	144	87 %
	1:8	19	152	93 %
2	Outspätt	286	-------	100 %
	1:2	139	278	97 %
	1:4	72	288	100 %
	1:8	36	288	101 %
3	Outspätt	750	-------	100 %
	1:2	357	714	95 %
	1:4	184	736	98 %
	1:8	100	800	106 %

NOGGRANNHET

Utbytesstudie (värden = pg/mL)

Bakgrundsvärde	Tillsatt kalibrerings-lösning	Förväntat värde	Uppmätt värde	Procent utbyte
Uppsättning 1				
24,3	50	74,3	77,9	107
24,3	150	174,3	186,3	108
24,3	450	474,3	464	98
Uppsättning 2				
17,7	50	67,7	69,5	104
17,7	150	167,7	177,6	107
17,7	450	467,7	471,7	101
Uppsättning 3				
19,5	50	69,5	72,4	106
19,5	150	169,5	179,4	107
19,5	450	469,5	461,2	98
Uppsättning 4				
10,6	50	60,6	60,4	100
10,6	150	160,6	163,9	102
10,6	450	460,6	435,8	94

15.3 Analytisk känslighet

Minsta detekterbara mängd, definierad som den synbarliga koncentrationen vid 2 standardavvikelser från CPM-värdet vid minimal bindning, är 0,7 pg/ml.

15.4 Analytisk specificitet

Korsreaktiviteten för N-tact PTH SP testades med följande humana PTH-fragment i en halt av 200 000 pg/mL.

Fragment	% korsreaktivitet
hPTH 39-84	<0,1
hPTH 53-84	<0,1
hPTH 39-68	<0,1
hPTH 44-68	<0,1
hPTH 1-34	<0,1
hPTH 13-34	<0,1
hPTH 1-84	100,0

FÖR REFERENSER HÄNVISAS TILL SISTA SIDAN

LATHUND FÖR TESTET

1. Rekonstituera de frystorkade reagensen och låt eventuella frysta prover tina helt. Låt reagens och tinade prover stå på is medan assayen förbereds.
2. Märk upp rör för dubbelprover.
3. Pipettera reagens enligt följande schema:

Rör/Reagens	Totalaktivitet	CAL 0-5	Kontroller och okända prover
Kalibreringslösningar	-	200 µL	-
Kontroller	-	-	200 µL
Okända prover	-	-	200 µL
Spårämne	100 µL	100 µL	100 µL

4. Blanda väl.
5. Tillsätt en pärla till varje rör.
6. Täck rören med parafilm, inkubera i 22 h (+/- 2 h) vid 20 - 25 °C.
7. Sug bort reaktionsblandningen från alla rör.
8. Tvätta pärlorna genom att spruta ned 1 mL tvättlösning i varje rör med så kraftig stråle att pärlan lyfts upp från provrörets botten. Sug bort tvättlösningen. Upprepa tvättproceduren 3 gånger.
9. Räkna varje rör i gammaräknare.

ΑΝΟΣΟΡΑΔΙΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΑΡΑΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΟΡΜΟΝΗΣ N-TACT®

1. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ IN VITRO.

Το παρόν κιτ περιέχει οδηγίες και τα υλικά για τον ποσοτικό προσδιορισμό της βιολογικά ενεργής αναλλοίωτης ανθρώπινης παραθυρεοειδούς ορμόνης (hPTH 1-84) σε ορό ή πλάσμα με ανοσοραδιομετρικό προσδιορισμό (IRMA).

2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Η διατήρηση των σωστών επιπέδων ασβεστίου στα κύτταρα και τα εξωκυττάρια υγρά είναι θεμελιώδους σημασίας για πολλές βιολογικές διεργασίες και η παραθυρεοειδής ορμόνη (PTH) είναι ένας από τους σημαντικότερους ρυθμιστές της ομοιόστασης ασβεστίου.

Κλινικά, η μέτρηση της PTH χρησιμοποιείται από κοινού με προσδιορισμούς ασβεστίου για την αξιολόγηση διαταραχών στο μεταβολισμό ασβεστίου.[1-3] Η μέτρηση της PTH έχει αποδειχτεί δύσκολη λόγω της ανομοιογένειας των πεπτιδίων που υπάρχουν τόσο στον αδένα όσο και στην κυκλοφορία αίματος.[4]

Η PTH συντίθεται στους παραθυρεοειδείς αδένες ως πρόδρομος ουσία του αμινοξέος 115 και αναφέρεται ως προ-προπαραθυρεοειδής ορμόνη. Η προ-προπαραθυρεοειδής ορμόνη μετατρέπεται σε μια ενδιάμεση μορφή αμινοξέος 90, την προπαραθυρεοειδή ορμόνη.[5] Πρόσθετη πρωτεϊνολυτική δράση μετατρέπει την ενδιάμεση ορμόνη σε βιολογικά ενεργή PTH 1-84.[6] Εκτός του σχηματισμού τεμαχίων εντός του αδένα, υπάρχει περαιτέρω πρωτεϊνολυτική διάσπαση της PTH όταν εισέλθει στην κυκλοφορία αίματος.[7, 8]

Επιστημονικές μελέτες υποδεικνύουν ότι μόνο η αναλλοίωτη PTH και τα τεμάχια PTH που περιέχουν την ακολουθία αμινοξέων 1-34 διαθέτουν βιολογική δραστηριότητα. Οι ασήμαντες συγκεντρώσεις των N-τελικών τεμαχίων συνεισφέρουν στο μίγμα της ανοσοδραστικής παραθυρεοειδούς ορμόνης στην κυκλοφορία αίματος. Επομένως, όταν χρησιμοποιούνται επίπεδα PTH για την αξιολόγηση ασθενών, η μέτρηση αναλλοίωτης PTH συσχετίζεται καλύτερα με την κατάστασή της στο μεταβολισμό ασβεστίου.[9-13]

Η παραθυρεοειδής ορμόνη και τα τεμάχιά της απομακρύνονται από την κυκλοφορία αίματος μέσω των νεφρών και του ήπατος.[14] Η κάθαρση των C-τελικών τεμαχίων είναι βραδύτερη από την κάθαρση της αναλλοίωτης ορμόνης και εξαρτάται περισσότερο από τους νεφρικούς μηχανισμούς.[15] Σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια σοβαρής μορφής ή τελικού σταδίου, η συσσώρευση των C-τελικών τεμαχίων βρίσκεται σε πολύ υψηλά επίπεδα. Όταν χρησιμοποιείται ένας προσδιορισμός PTH, ειδικός των C-τελικών, ενδεχομένως να βρεθούν αυξημένες συγκεντρώσεις PTH απλώς λόγω της μειωμένης κάθαρσης αυτών των βιολογικά ανενεργών τεμαχίων, περιπλέκοντας τη διαφοροποίηση της υπερασβεστιαιμίας.[8,16-18]

3. ΑΡΧΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Ο ανοσοραδιομετρικός προσδιορισμός (IRMA) αναλλοίωτης PTH SP της DiaSorin χρησιμοποιεί 2 διαφορετικά πολυκλωνικά αντισώματα που έχουν κεκαθαρθεί χρησιμοποιώντας χρωματογραφία συγγένειας. Αυτά τα κεκαθαρμένα αντισώματα είναι ειδικά για 2 διαφορετικές περιοχές του μορίου PTH.

Το πρώτο αντίσωμα, ειδικό για PTH 39-84, είναι δεσμευμένο σε μια στερεά φάση (σφαιρίδια πολυστυρενίου). Το δεύτερο αντίσωμα είναι ειδικό για την PTH 1-34 και είναι σημασμένο με ιώδιο-125. Τα δείγματα επωάζονται με τα δύο αντισώματα ταυτόχρονα. Η αναλλοίωτη PTH 1-84 περιέχει τόσο την ακολουθία αμινοξέων 1-34 όσο και την ακολουθία αμινοξέων 39-84 και είναι η μόνη μορφή PTH που θα δεσμευτεί τόσο από το αντίσωμα στο σφαιρίδιο όσο και από το αντίσωμα που είναι σημασμένο με ιώδιο 125.

Εφόσον το αντίσωμα που είναι συζευγμένο στη στερεά φάση είναι ειδικό για C-τελικά τεμάχια και τεμάχια μεσαίας περιοχής, καθώς και για την αναλλοίωτη PTH, η χωρητικότητα της στερεής φάσης έχει σχεδιαστεί για πολύ υψηλά επίπεδα PTH. Αυτό εμποδίζει την παρεμβολή από εξαιρετικά αυξημένα τεμάχια PTH C-τελικών και μεσαίας περιοχής τεμάχια PTH σε άγνωστα δείγματα.

Μετά την περίοδο επώασης, κάθε σφαιρίδιο εκπλένεται για να απομακρυνθεί τυχόν μη δεσμευμένο σημασμένο αντίσωμα. Κατόπιν, η ραδιενέργεια που υπάρχει στο υπόλοιπο δεσμευμένο σημασμένο αντίσωμα μετριέται χρησιμοποιώντας μετρητή γάμα.

Η συγκέντρωση της αναλλοίωτης PTH των δειγμάτων είναι ευθέως ανάλογη με τη μετρούμενη ραδιενέργεια.

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΚΙΤ

Βαθμονομητής 0 N-Tact PTH SP	1 φιαλίδιο/15 mL
Βαθμονομητές 1 έως 5 N-Tact PTH SP	5 φιαλίδια/2,0 mL
Σφαιρίδια N-Tact PTH SP	1 περιέκτης/100 σφαιρίδια
Αντίσωμα ^{125}I N-Tact PTH SP	2 φιαλίδια/5 mL
Συμπύκνωμα διαλύματος πλύσης N-Tact PTH SP	1 φιαλίδιο/50 mL
Μάρτυρες N-Tact PTH SP	2 φιαλίδια/2,0 mL
Αριθμός δοκιμών	100

ΦΥΛΑΞΗ: Μετά την παραλαβή του, το κιτ θα πρέπει να φυλάσσεται στους 2 έως 8°C. Μετά το άνοιγμα, φυλάξτε κάθε αντιδραστήριο στους 2 έως 8° έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα. Τα αντιδραστήρια δεν θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε περίπτωση που παρέλθει η ημερομηνία λήξης. Η ημερομηνία λήξης του κιτ αναγράφεται στην εξωτερική ετικέτα και αντιστοιχεί στην ημερομηνία λήξης του ιχνηθέτη.

Κατά την ανασύσταση του περιεχομένου των φιαλιδίων, αναμίξτε απαλά για να αποφευχθεί ο σχηματισμός αφρού. Φυλάξτε όλα τα ανασυσταθέντα αντιδραστήρια στους -15°C ή χαμηλότερα αμέσως μετά τη χρήση τους. Δεν ενδείκνυται η ανάμιξη αντιδραστηρίων από διαφορετικές παρτίδες.

4.1 Βαθμονομητής 0 N-Tact PTH SP: Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.
Περιέχει ανθρώπινο ορό με 0,1% αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό.

4.2 Βαθμονομητές 1 έως 5 N-tact PTH SP: Λυοφιλοποιημένο αντιδραστήριο
Ομάδα 5 βαθμονομητών 1-84 ανθρώπινης PTH, με ονομαστικές συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 15 έως 2000 pg/mL και περιέχουν 0,1% αζίδιο του νατρίου και άλλους σταθεροποιητές. Οι ακριβείς τιμές συγκέντρωσης προσδιορίζονται για κάθε παρτίδα. Εκτελέστε ανασύσταση κάθε φιαλιδίου λυοφιλοποιημένου βαθμονομητή με 2,0 mL του βαθμονομητή 0 που παρέχεται, αναμίξτε με στροβιλισμό και αφήστε τα για 5 λεπτά στους 2 έως 8°C ή έως ότου το περιεχόμενό τους έχει διαλυθεί πλήρως. Οι βαθμονομητές κιτ έχουν βαθμονομηθεί χρησιμοποιώντας συνθετική ανθρώπινη PTH. Ο χειρισμός των βαθμονομητών μπορεί να είναι ίδιος με αυτόν των δειγμάτων ασθενών όταν χρησιμοποιούνται με τα αντιδραστήρια και τη λειτουργική διαδικασία της παρούσας διαγνωστικής δοκιμής in vitro, όπως συνιστάται.

4.3 Σφαιρίδια N-Tact PTH SP: Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.
Τα σφαιρίδια πολυστυρενίου είναι επικαλυμμένα με αντίσωμα αίγας κεκαθαρμένο με συγγένεια και ειδικό για την ακολουθία αμινοξέων 39-84 της PTH.

4.4 ^{125}I: Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.
Κάθε φιαλίδιο περιέχει 5,0 mL αντίσωμα αίγας κεκαθαρμένο με συγγένεια, ειδικό για PTH 1-34 και σημασμένο με ιώδιο-125. Το σημασμένο αντίσωμα είναι αραιωμένο σε ρυθμισμένο ορό που περιέχει κόκκινη χρωστική και 0,1% αζίδιο του νατρίου.

4.5 Συμπύκνωμα διαλύματος πλύσης N-tact PTH SP: Αντιδραστήριο σε διάλυμα
Περιέχει ένα συμπυκνωμένο ρυθμισμένο επιφανειοδραστικό παράγοντα. Προετοιμάστε ένα διάλυμα πλύσης εργασίας αραιώνοντας όλο το περιεχόμενο του φιαλιδίου με 450 mL απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό. Φυλάξτε το διάλυμα πλύσης εργασίας σε θερμοκρασία δωματίου.

4.6 Μάρτυρας N-tact PTH SP, επίπεδο 1 και επίπεδο 2: Λυοφιλοποιημένο αντιδραστήριο
Στον ανθρώπινο ορό έχει προστεθεί hPTH 1-84 για να ληφθεί συγκέντρωση εντός μιας καθορισμένης περιοχής τιμών. Προστίθεται 0,1% αζίδιο του νατρίου. Εκτελέστε ανασύσταση κάθε λυοφιλοποιημένου μάρτυρα με 2,0 mL απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό, αναμίξτε και αφήστε στους 2 έως 8°C έως ότου το περιεχόμενο διαλυθεί εντελώς. Οι περιοχές τιμών για κάθε παρτίδα αναγράφονται στα φιαλίδια μαρτύρων.

5. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ IN VITRO.
Δεν προορίζεται για εσωτερική και εξωτερική χρήση σε ανθρώπους ή ζώα.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΥΛΙΚΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

Χειριστείτε ως εάν ήταν δυνητικώς μολυσματικά.

Κάθε μονάδα δότη ορού/πλάσματος που έχει χρησιμοποιηθεί για την προετοιμασία του παρόντος προϊόντος έχει δοκιμαστεί με μέθοδο εγκεκριμένη από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) των Η.Π.Α. και βρέθηκε μη αντιδραστική ως προς την παρουσία HBsAg, αντισώματος στον ιό HCV και αντισώματος στον ιό HIV 1/2. Αν και οι μέθοδοι αυτές είναι εξαιρετικά ακριβείς, δεν εγγυώνται την ανίχνευση όλων των μολυσματικών μονάδων. Το παρόν προϊόν ενδεχομένως να περιέχει και άλλο υλικό ανθρώπινης προέλευσης για το οποίο δεν υπάρχει εγκεκριμένη δοκιμή. Επειδή καμία γνωστή μέθοδος δοκιμής δεν μπορεί να προσφέρει πλήρης διαβεβαίωση ότι απουσιάζουν ο ιός της ηπατίτιδας B (HBV), ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV), ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) ή άλλοι μολυσματικοί παράγοντες, ο χειρισμός όλων των προϊόντων που περιέχουν υλικά ανθρώπινης προέλευσης θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με καλές εργαστηριακές πρακτικές χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες προφυλάξεις, όπως περιγράφονται στο εγχειρίδιο «Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories», 4η έκδοση, Μάιος 1999 ή την τρέχουσα έκδοση, των U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health (Κέντρα για τον Έλεγχο και Πρόληψη Νόσων/Εθνικά Ιδρύματα Υγείας των Η.Π.Α.).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΑΖΙΔΙΟ ΤΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ

ΠΡΟΣΟΧΗ: Μερικά αντιδραστήρια στο κιτ αυτό περιέχουν αζίδιο του νατρίου. Το αζίδιο του νατρίου μπορεί να αντιδράσει με τις σωληνώσεις μολύβδου ή χαλκού και να σχηματίσει εξαιρετικά εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη, εκπλύνετε με άφθονη ποσότητα νερού για να εμποδίσετε τη συσσώρευση αζιδίων. Για πρόσθετες πληροφορίες, ανατρέξτε στην ενότητα «Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts», στο εγχειρίδιο οδηγό - διαχείριση ασφάλειας με κωδικό CDC-22 που εκδίδεται από τα Κέντρα για τον Έλεγχο και την Πρόληψη Νόσων στην Ατλάντα της Τζόρτζια, 1976.

Φράσεις κινδύνου επικίνδυνων ουσιών των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (Οδηγία Επιτροπής 1999/45/ΕΕ)
R20/21/22 - Βλαβερό όταν εισπνέεται, σε επαφή με το δέρμα και σε περίπτωση κατάποσης.
R32 - Σε επαφή με οξέα ελευθερώνονται πολύ τοξικά αέρια.
S28 - Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα, πλύνετε αμέσως με άφθονο νερό.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΙΩΔΙΟ-125

Το κιτ αυτό περιέχει ραδιενεργό υλικό το οποίο δεν υπερβαίνει τα 20 μCi (740kBq) ιώδιο-125. Κατά τη φύλαξη, το χειρισμό και τη διάθεση του υλικού αυτού, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες προφυλάξεις και καλές εργαστηριακές πρακτικές.
Προς ιατρούς ή ιδρύματα που παραλαμβάνουν ραδιοϊσότοπα κάτω από γενική άδεια:
Το παρόν ραδιενεργό υλικό μπορεί να ληφθεί, να αποκτηθεί, να κατέχεται και να χρησιμοποιείται μόνο από ιατρούς, κτηνίατρους που εξασκούν κτηνιατρική ιατρική, κλινικά εργαστήρια ή νοσοκομεία και μόνο για κλινικές ή εργαστηριακές δοκιμές in vitro που δεν περιλαμβάνουν την εσωτερική ή εξωτερική χορήγηση του υλικού, ή της ακτινοβολίας αυτού, σε ανθρώπους και ζώα. Η παραλαβή, η απόκτηση, η κατοχή, η χρήση και η μεταφορά υπόκεινται στους κανονισμούς και τη γενική άδεια της Ρυθμιστικής Επιτροπής Πυρηνικών των Η.Π.Α. (NRC) της πολιτείας στην οποία η επιτροπή έχει συνάψει συμφωνία για την άσκηση καθηκόντων αρμόδιας αρχής.

1. Η φύλαξη του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να περιοριστεί σε μια ειδικά επισημασμένη περιοχή.
2. Η πρόσβαση σε ραδιενεργά υλικά πρέπει να περιοριστεί μόνο σε εξουσιοδοτημένο προσωπικό.
3. Μη χρησιμοποιείτε πιπέτα με το στόμα σε ραδιενεργά διαλύματα.

4. Μην τρώτε ή πίνετε εντός των επισημασμένων ραδιενεργών περιοχών εργασίας.
5. Οι περιοχές, όπου ενδεχομένως να έχουν προκληθεί εκχύσεις, θα πρέπει να σκουπιστούν και κατόπιν να πλυθούν με αλκαλικό απορρυπαντικό ή ραδιολογικό απολυμαντικό διάλυμα. Τυχόν υάλινα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να εκπλυθούν καλά με νερό πριν από την πλύση άλλων εργαστηριακών υάλινων σκευών.

Προς ιατρούς ή ιδρύματα που παραλαμβάνουν ραδιοϊσότοπα κάτω από ειδική άδεια:
Η παραλαβή, η χρήση, η μεταφορά και η διάθεση των ραδιενεργών υλικών υπόκεινται στους κανονισμούς και τις συνθήκες της ειδικής άδειάς σας.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ: Το προϊόν αυτό περιέχει μια χημική ουσία η οποία είναι γνωστό από την πολιτεία της Καλιφόρνιας ότι προκαλεί καρκίνο.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Η ραδιενέργεια που αναγράφεται στο ένθετο συσκευασίας μπορεί να διαφέρει ελαφρώς από τη ραδιενέργεια που αναγράφεται στην ετικέτα συσκευασίας ή στην ετικέτα φιαλιδίου ιχνηθέτη. Η ετικέτα συσκευασίας και η ετικέτα φιαλιδίου ιχνηθέτη υποδεικνύουν την πραγματική ποσότητα ραδιενέργειας κατά την ημερομηνία βαθμονόμησης, ενώ το ένθετο συσκευασίας υποδεικνύει τη θεωρητική ραδιενέργεια του κιτ.

6. ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΦΘΟΡΑΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΚΙΤ

6.1 Μετατόπιση της κλίσης ή της θέσης της καμπύλης βαθμονόμησης σε σχέση με αυτήν που λαμβάνεται κανονικά.

6.2 Μείωση της μέγιστης δέσμευσης.

6.3 Υψηλή μη ειδική μηδενική δέσμευση.

6.4 Πτωχές τιμές επαναλήψεων.

7. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Για χρήση στον προσδιορισμό N-tact PTH SP, απαιτούνται διακόσια μικρόλιτρα ορού ή πλάσματος EDTA, εις διπλούν.

Με το κιτ αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ανθρώπινος ορός ή πλάσμα. Με τον προσδιορισμό αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντιπηκτικά EDTA. Συνιστάται δείγμα από άτομα που δεν έχουν φάει, αλλά δεν απαιτείται. Η δειγματοληψία θα πρέπει να γίνεται ασηπτικά με φλεβοπαρακέντηση σε κενό υάλινο δοκιμαστικό σωλήνα 5 ή 10 mL. Αφήστε το αίμα να πήξει σε θερμοκρασία δωματίου (15 έως 25°C). Φυγοκεντρήστε για 15 λεπτά χρησιμοποιώντας 760 x g* περίπου για να λάβετε ορό χωρίς αιμόλυση. Δεν απαιτούνται πρόσθετα ή συντηρητικά για τη διατήρηση της ακεραιότητας του δείγματος. Όλα τα πλαστικά και υάλινα σκεύη ή άλλα υλικά που έρχονται σε επαφή με το δείγμα δεν θα πρέπει να είναι μολυσμένα. Φυλάξτε τα δείγματα ορού ή πλάσματος στους -20°C ή χαμηλότερα. Τα δείγματα μπορεί να φυλαχτούν σε υάλινα ή πλαστικά φιαλίδια αρκεί αυτά να είναι ερμητικά σφραγισμένα προκειμένου να αποφευχθεί η αποξήρανση του δείγματος.

Σε εργαστήρια της DiaSorin συγκρίθηκαν δείγματα φυσιολογικού πλάσματος EDTA και ορού. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις τιμές.

8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

8.1 Εκτελέστε ανασύσταση των λυοφιλοποιημένων αντιδραστηρίων και αφήστε τυχόν καταψυγμένα δείγματα να αποψυχθούν εντελώς. Διατηρήστε τα αντιδραστήρια και τα αποψυγμένα δείγματα σε πάγο ενώ προετοιμάζετε τον προσδιορισμό.

8.2 Τακτοποιήστε δύο πανομοιότυπους δοκιμαστικούς σωλήνες 12 x 75 χλστ από βοριοπυριτικό ύαλο σύμφωνα με το σχήμα του προσδιορισμού.

8.3 Προσθέστε τα αντιδραστήρια στους δοκιμαστικούς σωλήνες ως ακολούθως:

α. Δοκιμαστικοί σωλήνες συνολικών κρούσεων
100 µL αντίσωμα N-tact PTH SP ^{125}I (κόκκινο)

β. Βαθμονομητής 0
200 µL βαθμονομητή 0
100 µL αντίσωμα N-tact PTH SP ^{125}I (κόκκινο)

*g = (1118×10^{-8}) (ακτίνα σε εκατοστά) $(\text{rpm})^2$

γ. Βαθμονομητές (1-5)
200 μL βαθμονομητής
100 μL αντίσωμα N-tact PTH SP ^{125}I (κόκκινο)

δ. Μάρτυρες και άγνωστα δείγματα
200 μL δείγμα
100 μL αντίσωμα N-tact PTH SP ^{125}I (κόκκινο)

8.4 Στροβιλίστε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες σε όργανο περιδίνησης (vortex).

8.5 Διανείμετε ένα σφαιρίδιο σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα με μια λαβίδα επικαλυμμένη με teflon ή με ένα διανομέα κατάλληλο για το χειρισμό σφαιριδίων. (Μη χρησιμοποιείτε τα δάκτυλά σας).

8.6 Καλύψτε τους δοκιμαστικούς σωλήνες με parafilm ή ισοδύναμο.

8.7 Επωάστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες για 22 (±2) ώρες στους 20 έως 25°C.

8.8 Αναρροφήστε το μίγμα αντίδρασης από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.

8.9 Πλύνετε τα σφαιρίδια διανέμοντας σθεναρά 1 mL διάλυμα έκπλυσης σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα με αρκετή δύναμη ώστε να ανυψωθεί το σφαιρίδιο από τον πυθμένα του δοκιμαστικού σωλήνα. Αναρροφήστε το διάλυμα πλύσης. Επαναλάβετε τη διαδικασία πλύσης 3 φορές.

8.10 Μετρήστε τη ραδιενέργεια που υπάρχει σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα χρησιμοποιώντας μετρητή γάμα.

9. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ, ΟΜΩΣ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

9.1 Αναλώσιμοι δοκιμαστικοί σωλήνες από βοριοπυριτικό ύαλο, 12 x 75 χλστ.

9.2 Βάση δοκιμαστικών σωλήνων.

9.3 Μετρητής γάμα με δυνατότητα μέτρησης ιωδίου 125.

9.4 Όργανο περιδίνησης (vortex).

9.5 Συσκευές πιπέτας

α. Μικροπιπέτα βαθμονομημένη να διανέμει 200 μL.

β. Διανομείς επαναλαμβανόμενης χορήγησης, βαθμονομημένοι να διανέμουν 100 μL και 1 mL.

γ. Ογκομετρικές πιπέτες για την ανασύσταση των μαρτύρων και των βαθμονομητών.

9.6 Parafilm ή ισοδύναμο για την κάλυψη των δοκιμαστικών σωλήνων.

9.7 Λαβίδα επικαλυμμένη με Teflon ή άλλη συσκευή για τη διανομή σφαιριδίων εγκεκριμένη για το κιτ.

9.8 Συσκευή αναρρόφησης για την αναρρόφηση του αντισώματος ^{125}I και των διαλυμάτων πλύσης.

10. ΔΙΑΔΙΚΑΣΤΙΚΑ ΣΧΟΛΙΑ

10.1 Όταν προσθέτετε σφαιρίδια στους δοκιμαστικούς σωλήνες, γείρετε ελαφρώς τη βάση των δοκιμαστικών σωλήνων και αφήστε τα σφαιρίδια να κυλήσουν μέσα στους δοκιμαστικούς σωλήνες. Αυτό θα εμποδίσει το υπερβολικό πάφλασμα του διαλύματος δοκιμής. Μη χειρίζεστε τα σφαιρίδια με τα δάκτυλά σας.

10.2 Διανέμετε το αντίσωμα ^{125}I με πιπέτα στο κάτω ένα τρίτο του δοκιμαστικού σωλήνα.

*g = (1118 x 10^{-8}) (ακτίνα σε εκατοστά) $(rpm)^2$

10.3 Για να παρακολουθείτε πλήρως τη συνεπή απόδοση ενός προσδιορισμού RIA, υπάρχουν πρόσθετοι παράγοντες που πρέπει να ελέγχονται. Η DiaSorin προτείνει έλεγχο των παρακάτω παραμέτρων για να εξασφαλιστεί η συνεπής απόδοση του κιτ.

α. Συνολικές κρούσεις

β. Μέγιστη δέσμευση
Κρούσεις ανά λεπτό (CPM) του δοκιμαστικού σωλήνα βαθμονομητή 2000

γ. Μη ειδική δέσμευση
CPM δοκιμαστικού σωλήνα βαθμονομητή 0

11. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να περιλαμβάνει και τους δύο ορούς μάρτυρες του κιτ σε κάθε προσδιορισμό για να εξασφαλίσει την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων κάθε προσδιορισμού. Κατόπιν, θα πρέπει να καθοριστεί μέση και τυπική απόκλιση για κάθε μάρτυρα χρησιμοποιώντας τουλάχιστον δέκα (10) προσδιορισμούς. Μια αποδεκτή περιοχή τιμών μπορεί κατόπιν να ληφθεί για τους μάρτυρες αυτούς χρησιμοποιώντας ±2 τυπικές αποκλίσεις των τιμών που καθορίστηκαν προηγουμένως. Το εργαστήριο ποιοτικού ελέγχου της DiaSorin έχει καθορίσει μια περιοχή τιμών για τους μάρτυρες που περιλαμβάνονται στο κιτ αυτό.

12. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για να υπολογίσετε τη συγκέντρωση της αναλλοίωτης PTH που υπάρχει σε ένα άγνωστο δείγμα και στα δείγματα μάρτυρες, προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας τις συγκεντρώσεις βαθμονομητή που αναγράφονται στις ετικέτες των φιαλιδίων. Οι τιμές υπολογίζονται ως ακολούθως:

12.1 Υπολογίστε τη μέση τιμή CPM για κάθε βαθμονομητή, μάρτυρα και άγνωστο δείγμα.

12.2 Αφαιρέστε τη μέση τιμή CPM των δοκιμαστικών σωλήνων του βαθμονομητή 0 από όλες τις μέσες κρούσεις για να λάβετε διορθωμένα CPM.

12.3 Χρησιμοποιώντας γραφικό χαρτί log-log, σχεδιάστε τα διορθωμένα CPM για κάθε επίπεδο βαθμονομητή στην τεταγμένη και τις συγκεντρώσεις βαθμονομητή στην τετμημένη.

12.4 Υπολογίστε τις συγκεντρώσεις PTH των δειγμάτων με παρεμβολή από τη γραφική αναπαράσταση.

12.5 Αν η τιμή οποιουδήποτε άγνωστου δείγματος είναι μεγαλύτερη από το βαθμονομητή με την υψηλότερη τιμή, αυτό θα πρέπει να αραιωθεί κατάλληλα με βαθμονομητή 0 και να γίνει ξανά ο προσδιορισμός του.

12.6 Αν ένα άγνωστο δείγμα έχει αραιωθεί, διορθώστε το με τον κατάλληλο παράγοντα αραίωσης.

12.7 Οι τιμές που είναι μικρότερες από το βαθμονομητή 1 αλλά υψηλότερες από 0,7 pg/mL (ευαισθησία προσδιορισμού) μπορεί να υπολογιστούν χρησιμοποιώντας τον τύπο:

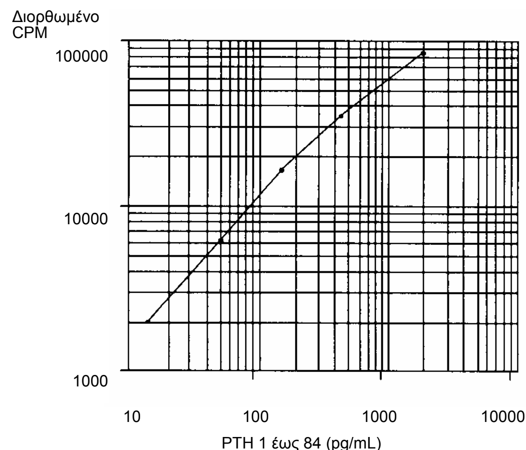
$$\text{Τιμές άγνωστου} = \frac{\text{Διορθωμένες CPM (άγνωστο)}}{\text{Διορθωμένες CPM (Βαθ. 1)}} \times \text{Τιμή βαθμονομητή 1}$$

ΠΙΝΑΚΑΣ I
Δεδομένα δείγματος N-Tact PTH SP

Δοκιμαστικός σωλήνας	Πανομοιότυπο CPM	Μέσο CPM	Διορθωμένο CPM	Συγκέντρωση (pg/mL)	B/T
Συνολικές κρούσεις	260.242 253.536	256.889			
Βαθμονομητής 0	384 374	379			
Βαθμονομητές (pg/mL)					
1 (15)	2.324 2,351	2.338	1.959		
2 (50)	6.469 6,630	6.550	6.171		
3 (150)	16.390 16,289	16.340	15.961		
4 (450)	34.605 35,246	34.926	34.547		
5 (2.000) 84.050	85.678	84.864	84.485		33%
Άγνωστα δείγματα					
1	6.494 6,450	6.472	6.093	49	
2	34.144 34,932	34.538	34.159	442	

Στον ΠΙΝΑΚΑ I και στο ΣΧΗΜΑ 1 παρουσιάζονται τυπικά δεδομένα δείγματος και μια καμπύλη βαθμονόμησης για αναλλοίωτη PTH SP. Οι πληροφορίες αυτές δίδονται μόνο για αναφορά και δεν πρέπει να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό καμίας τιμής.

ΚΑΜΠΥΛΗ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ PTH SP N-tact



ΣΧΗΜΑ 1

13. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

13.1 Αν η αρχική συγκέντρωση ενός άγνωστου δείγματος είναι μεγαλύτερη από το βαθμονομητή με την υψηλότερη τιμή, αραιώστε το μόνο με βαθμονομητή 0.

13.2 Οι χρόνοι μέτρησης θα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλοι για να μειώσουν το στατιστικό σφάλμα (για παράδειγμα, η συσσώρευση 2.000 CPM θα αποδώσει σφάλμα 5%, ενώ 10.000 CPM θα αποδώσει σφάλμα 1%).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΝΑΓΩΓΗΣ

Το εργαστήριο ποιοτικού ελέγχου της DiaSorin χρησιμοποιεί προσαρμογή καμπύλης smooth spline.

14. ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ

Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει τη δική του κανονική περιοχή τιμών. Έχει καθοριστεί μια φυσιολογική περιοχή τιμών από την DiaSorin χρησιμοποιώντας ορό από 129 φαινομενικά υγιείς ενήλικες με άδειο στομάχι. Η γεωμετρική μέση τιμή υπολογίστηκε 26 pg/mL με διπλό εύρος τυπικής απόκλισης που κυμαίνεται από 13 έως 54 pg/mL.

ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

1. Αναλύθηκαν με το σύστημα προσδιορισμού N-tact PTH SP δείγματα ορού από σαράντα έξι (46) ασθενείς με πρωτεύοντα υπερθυρεοειδισμό. Οι τιμές αναλλοίωτης PTH κυμαίνονται από 43,6 έως 686,1 pg/mL.
2. Αναλύθηκαν με το σύστημα προσδιορισμού N-tact PTH SP δεκατέσσερα (14) δείγματα από ασθενείς που έπασχαν από υπερθυρεοειδισμό. Οι τιμές για την αναλλοίωτη PTH κυμαίνονται από 0 έως 20,6 pg/mL.
3. Αναλύθηκαν με το σύστημα προσδιορισμού N-tact PTH SP σαράντα οκτώ (48) δείγματα ασθενών με χρόνια νεφροπάθεια. Οι τιμές αναλλοίωτης PTH κυμαίνονται από 10,3 έως 1042 pg/mL.
4. Αναλύθηκαν με το σύστημα προσδιορισμού N-tact PTH SP τέσσερα (4) δείγματα ασθενών που έπασχαν από κληρονομικό υπερπαραθυρεοειδισμό. Οι τιμές αναλλοίωτου PTH κυμαίνονται από 59,5 έως 100,5 pg/mL.

15. ΕΙΔΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

15.1 Ακρίβεια

Απόκλιση για τον ίδιο προσδιορισμό (τιμές = pg/mL). Δοκιμάστηκαν τρεις μάρτυρες ορού σε 20 πανομοιότυπες εκτελέσεις ενός μοναδικού προσδιορισμού για να καθοριστεί η απόκλιση εντός του προσδιορισμού.

Αριθμός δείγματος	Μέση τιμή	Τ.Α.	%Σ.Δ.
1	26	0,9	3,6
2	276	5,4	2,0
3	1,125	27,5	2,4

Απόκλιση μεταξύ σειράς προσδιορισμών (τιμές = pg/mL). Δοκιμάστηκαν τρεις μάρτυρες ορού από 4 τεχνικούς σε 20 ξεχωριστούς προσδιορισμούς για να καθοριστεί η απόκλιση μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών.

Αριθμός δείγματος	Μέση τιμή	Τ.Α.	%Σ.Δ.
1	49	1,6	3,4
2	285	13,1	4,6
3	1,111	54,8	4,9

15.2 Αληθινότητα: Η αληθινότητα προσδιορισμού ελέγχθηκε με τη δοκιμή αραίωσης και τη δοκιμή ανάκτησης.

Παραλληλισμός

Μελέτη διαδοχικών αραιώσεων 3 αγνώστων δειγμάτων (τιμές = pg/mL) (Δείγματα αραιωμένα με βαθμονομητή 0).

Αριθμός δείγματος	Αραίωση	Μετρούμενη	Διορθωμένο για αραίωση	% που λήφθηκε
1	Μη αραιωμένο	164	-------	100%
	1:2	77	154	94%
	1:4	36	144	87%
	1:8	19	152	93%
2	Μη αραιωμένο	286	-------	100%
	1:2	139	278	97%
	1:4	72	288	100%
	1:8	36	288	101%
3	Μη αραιωμένο	750	-------	100%
	1:2	357	714	95%
	1:4	184	736	98%
	1:8	100	800	106%

ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Μελέτη ανάκτησης (τιμές = pg/mL)

Τιμή υπόβαθρου	Βαθμονομητής που προστέθηκε	Αναμενόμενη τιμή	Μετρούμενη τιμή	Ποσοστιαία ανάκτηση
Ομάδα αρ. 1				
24.3	50	74,3	77,9	107
24.3	150	174,3	186,3	108
24.3	450	474,3	464	98
Ομάδα αρ. 2				
17.7	50	67,7	69,5	104
17.7	150	167,7	177,6	107
17.7	450	467,7	471,7	101
Ομάδα αρ. 3				
19.5	50	69,5	72,4	106
19.5	150	169,5	179,4	107
19.5	450	469,5	461,2	98
Ομάδα αρ. 4				
10.6	50	60,6	60,4	100
10.6	150	160,6	163,9	102
10.6	450	460,6	435,8	94

15.3 Αναλυτική ευαισθησία

Όταν ορίζεται ως η φαινομενική συγκέντρωση σε 2 τυπικές αποκλίσεις από τις κρούσεις σε ελάχιστη δέσμευση, η ελάχιστη ποσότητα που ανιχνεύεται είναι 0,7 pg/mL.

15.4 Αναλυτική ειδικότητα

Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα του συστήματος N-tact PTH SP πραγματοποιήθηκε με τα ακόλουθα ανθρώπινα τεμάχια PTH στα 200.000 pg/mL.

Τεμάχιο	% διασταυρούμενη αντιδραστικότητα
hPTH 39-84	<0,1
hPTH 53-84	<0,1
hPTH 39-68	<0,1
hPTH 44-68	<0,1
hPTH 1-34	<0,1
hPTH 13-34	<0,1
hPTH 1-84	100,0

ΓΙΑ ΤΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ, ΑΝΑΤΡΕΞΤΕ ΣΤΗΝ ΤΕΛΕΥΤΑΙΑ ΣΕΛΙΔΑ

ΣΧΗΜΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

1. Εκτελέστε ανασύσταση των λυοφιλοποιημένων αντιδραστηρίων και αφήστε τυχόν καταψυγμένα δείγματα να αποψυχθούν εντελώς. Διατηρήστε τα αντιδραστήρια και τα αποψυγμένα δείγματα σε πάγο ενώ προετοιμάζετε τον προσδιορισμό.
2. Αναγνωρίστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες εις διπλούν.
3. Διανέμετε τα αντιδραστήρια σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα.

Δοκιμαστικοί σωλήνες/Αντιδραστήρια	Συνολικές κρούσεις	Βαθμ. 0 έως 5	Μάρτυρας και άγνωστα δείγματα
Βαθμονομητές	-	200 µL	-
Χειριστήρια	-	-	200 µL
Άγνωστα δείγματα	-	-	200 µL
Ιχνηθέτης	100 µL	100 µL	100 µL

4. Αναμίξτε καλά.
5. Διανέμετε 1 σφαιρίδιο σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες.
6. Καλύψτε τους δοκιμαστικούς σωλήνες με parafilm και επωάστε για 22 ώρες (+/- 2 ώρες) στους 20 έως 25°C.
7. Αναρροφήστε το μίγμα αντίδρασης από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.
8. Πλύνετε τα σφαιρίδια διανέμοντας σθεναρά 1 mL διάλυμα έκπλυσης σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα με αρκετή δύναμη ώστε να ανυψωθεί το σφαιρίδιο από τον πυθμένα του δοκιμαστικού σωλήνα. Αναρροφήστε το διάλυμα πλύσης. Επαναλάβετε τη διαδικασία πλύσης 3 φορές.
9. Μετρήστε κάθε σωλήνα σε ένα μετρητή γάμα.

REFERENCES/BIBLOGRAPHIE/LITERATUR/BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAFIA/ REFERÊNCIAS/REFERENSER/ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Pribor, H.C., and L.F. Fabisinski, "Artificial Intelligence in Laboratory Medicine III: The Parathyroid Hormone Profile," **MLO,** (1983).

2. Habener, J.F. and G.V. Segre, "Parathyroid Hormone Radioimmunoassay," **Annals of Internal Medicine,** 91(5):782, (1979).

3. Kao, P.C., N. Jiang, et. al., "Development and Validation of a New Radioimmuno-assay for Parathyrin (PTH)," **Clinical Chemistry,** 28(1):69, (1982).

4. Lindall, A.W. and E.T. Wong, "Column Chromatography of Human Serum Para-thyroid Immunoreactive Peptides," **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine,** 148:799, (1975).

5. Wong, E.T. and A.W. Lindall, "Preliminary Evidence for a Microsomal Precursor to Human Parathyroid Hormone," **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine,** 148:387, (1975).

6. Habener, J.F. and J.T. Potts, Jr., "Biosynthesis of Parathyroid Hormone," **The New England Journal of Medicine,** 299 (11 & 12):580 and 635, (1978).

7. Segre, G.V., J.F. Habener, et. al., "Parathyroid Hormone in Human Plasma," **The Journal of Clinical Investigation,** 51:3163, (1972).

8. Martin, K.J., K.A. Hruska, et. al., "The Peripheral Metabolism of Parathyroid Hormone," **New England Journal of Medicine,** 301:1092, (1979).

9. Dambacher, M.A., J.A. Fischer, et. al., "Distribution of Circulating Immunoreactive Components of Parathyroid Hormone in Normal Subjects and in Patients with Primary and Secondary Hyperparathyroidism: The Role of the Kidney and of the Serum Calcium Concentration," **Clinical Science,** 57:435, (1979).

10. Chu, S.Y. and A.K. Chu, "Intact vs. C-terminal/Mid-region Parathyrin (PTH) Assay in Diagnosis of Hyperparathyroidism - a Clinical Evaluation," **Clinical Chemistry,** 32(12): 2206, (1986).

11. Goltzman, D., B. Henderson, et. al., "Cytochemical Bioassay of Parathyroid Hormone, Characteristics of the Assay and Analysis of Circulating Hormone Forms," **Journal of Clinical Investigation,** 63:1309, (1980).

12. Lindall, A.W., J. Elting, et. al., "Estimation of Biologically Active Parathyroid Hormone in Normal and Hyperparathyroid Sera by Sequential N-terminal Immuno-extraction and Mid-region Radioimmunoassay," **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,** 57(5):1007, (1983).

13. Endres, D.B. and R. Villanueva, "Immunochemiluminometric and Immunoradio-metric Determinations of Intact and Total Immunoreactive Parathyrin: Performance in the Differential Diagnosis of Hypercalcemia and Hypoparathyroidism," **Clinical Chemistry,** 37(2):162, (1991).

14. Potts, J.T., and J.F. Habener, "Fundamental Considerations in the Physiology, Biology, and Biochemistry of Parathyroid Hormone," **Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders,** Avioli and Krane Eds., W.B. Saunders, Second Edition: 69, (1990).

15. Freigtag, J., K.J. Martin, et. al., "Impaired Parathyroid Hormone Metabolism in Patients with Chronic Renal Failure," **New England Journal of Medicine,** 298(1):29, (1978).

16. Schmidt-Gayk, H., M. Schmitt-Fiebig, et. al., "Two Homologous Radioimmuno-assays for Parathyrin Compared and Applied to Disorders of Calcium Metabolism," **Clinical Chemistry,** 32:57, (1986).

17. Parnham, A.J., F.C.R. Wijeyesingh, et. al., "Intact Parathyroid Hormone assay Offer Increased Sensitivity Over C-terminal Assays in The Study of Parathyroid Graft Function," **Nephron,** 44:8, (1986).

18. Hackeng, W.H.L., P. Lips, et. al., "Clinical Implications of Estimation of Intact Para-thyroid Hormone (PTH) Versus Total Immunoreactive PTH in Normal Subjects and Hyperparathyroid Patients," **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,** 63(2):447, (1986).

SYMBOLS USED WITH DEVICES

Symbol	English	Français	Deutsch	Español	Italiano
	European Conformity	Conformité aux normes européennes	CE – Konformitäts-kennzeichnung	Conformidad europea	Conformità europea
	Expiration Date	Date limite d'utilisation	Mindesthaltbar-keitsdatum	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Manufacturer	Fabricant	Hersteller	Fabricante	Fabbricante
	Consult Instructions for Use	Consulter les instructions d'utilisation	Gebrauchsanwei-sung beachten	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
IVD	In vitro diagnostic.	Diagnostic in vitro.	In-vitro-Diagnostikum.	Diagnóstico in vitro.	Diagnostica in vitro.
LOT	Lot No.	No. de lot	Chargen-Nr.	Número de lote	Lotto n°
	Temperature limitation.	Limitation de température.	Temperaturbereich	Limitación de temperatura	Limite della temperatura
Ab	Antiserum	Antisérum	Antiserum	Antisuero	Antisiero
Ab PEG	Precipitating reagent	Réactif précipitant	Fällungsreagenz	Reactivo precipitante	Reagente precipitante
Ag ^{125}I	Tracer: antigen labelled with ^{125}I	Traceur : antigène marqué à l'iode ^{125}	Tracer: ^{125}I-markiertes Antigen	Trazador: antígeno etiquetado con ^{125}I	Tracciatore: antigene etichettato con ^{125}I
BUF	Buffer	Tampon	Puffer	Tampón	Tampone
CAL	Calibrator	Étalon	Kalibrator	Calibrador	Calibratore
CONTROL	Control serum	Sérum de contrôle	Kontrollserum	Suero de control	Siero di controllo
REAG	Reagent	Réactif	Reagenz	Reactivo	Reagente
	Radioactive	Radioactif	Radioaktiv	Radiactivo	Radioattivo
	Highly flammable	Facilement inflammable	Leichtentzündlich	Fácilment inflamable	Facilment infiammabile
Xn	Harmful	Nocif	Gesundheits-schädlich	Nocivo	Nocivo

SYMBOLS USED WITH DEVICES CONTINUED ON NEXT PAGE.

CONTINUED FROM PREVIOUS PAGE - SYMBOLS USED WITH DEVICES

	Português	Svenska	Ελληνικά
CE	Conformidade com as normas europeias	Europeisk överensstämmeise	Ευρωπαϊκή Συμμόρφωση
	Prazo de validade	Utgångsdatum	Ημερομηνία Λήξης
	Fabricante	Tilverkare	Κατασκευαστής
	Consulte as instruções de utilização	Se bruksanvisningen	Συμβουλευτείτε τις Οδηγίες Χρήσης
IVD	Diagnóstico in vitro.	Diagnostik in vitro.	In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν.
LOT	N.º do lote	Batch-nummer	Αρ. παρτίδας
	Limite de temperatura.	Temperatur-begränsning.	Περιορισμοί θερμοκρασίας
Ab	Anti-soro	Antiserum	Αντιορός
Ab PEG	Precipitado no reagente	Utfällningsreagens	Αντιδραστήριο καθίζησης
Ag ^{125}I	Traçador: antígeno marcado com ^{125}I	Spårelement: antigen betecknad med ^{125}I	Ιχνηθέτης: Αντιγόνο σημασμένο με ^{125}I
BUF	Tampão	Buffert	Ρυθμιστικό διάλυμα
CAL	Calibrador	Kalibrator	Βαθμονομητής
CONTROL	Soro de controlo	Kontrollserum	Ορός μάρτυρα
REAG	Reagente	Reagens	Αντιδραστήριο
	Radioactivo	Radioaktiv	Ραδιενεργό
	Facilmente inflamavel	Mycket brandfarligt	Πολύ εύφλεκτο
Xn	Nocivo	Skadligt	Επιβλαβής

Distribué Par :

DiaSorin S.A.
11, rue Georges Besse
92160 Antony, France





DiaSorin Inc.
1951 Northwestern Avenue
P.O. Box 285
Stillwater, MN 55082-0285 U.S.A.

Phone: 651-439-9710
FAX: 651-779-7847

For Customer Service in the
U.S. and Canada Call Toll Free:
800-328-1482

In the United Kingdom Call:
44 118 9364200
FAX: 44 118 9792061

27121
12621 6/03

PRINTED IN U.S.A.